

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FARMACOLOGIA

RANDRIELY MERSCHER SOBREIRA DE LIMA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS NEUROQUÍMICOS E COMPORTAMENTAIS DO  
ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL EM ANIMAIS SUBMETIDOS A PRIVAÇÃO  
MATERNAL**

VITÓRIA  
2017

RANDRIELY MERSCHER SOBREIRA DE LIMA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS NEUROQUÍMICOS E COMPORTAMENTAIS DO  
ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL EM ANIMAIS SUBMETIDOS A PRIVAÇÃO  
MATERNAL**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Bioquímica da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Farmacologia.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Paula Santana de Vasconcellos Bittencourt.

Co-orientador: Prof. Dr. Athelson Stefanon Bittencourt

VITÓRIA  
2017

*Dedico esta dissertação, com muito amor, aos meus pais, por me ensinarem o significado do amor e me apoiarem incondicionalmente. O meu amor, admiração e gratidão por vocês será eterno.*

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do  
Espírito Santo, ES, Brasil)

---

Lima, Randriely Merscher Sobreira de, 1993 -

L732a      Avaliação dos efeitos neuroquímicos e comportamentais do  
enriquecimento ambiental em animais submetidos a privação materna /  
Randriely Merscher Sobreira de Lima - 2017

108 f. : il.

Orientador: Ana Paula Santana de Vasconcellos Bittencourt.

Coorientador: Athelson Stefanon Bittencourt.

Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Farmacologia) – Universidade  
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Privação Materna. 2. Ansiedade. 3. Serotoninérgicos. I. Bittencourt, Ana  
Paula Santana de Vasconcellos. II. Bittencourt, Athelson Stefanon.  
III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde.  
IV. Título.

CDU: 61

---

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pelas oportunidades!

Aos meus pais, que me proporcionaram chegar até aqui, demonstrando com amor que acreditam e confiam nas minhas decisões, por mais difíceis e incompreensíveis que possam ser. Ao meu pai, Antonio, por toda dedicação e sacrifício para que eu realize meus sonhos. À minha mãe, Rosinete, exemplo de mãe e amor, que não mede esforços para garantir a felicidade dos filhos. A vocês também agradeço a família mais linda e diversificada que alguém poderia ter. O mundo seria muito melhor se as pessoas conhecessem o amor que vocês vivem. Amo e admiro incondicionalmente vocês!

À minha família agradeço o apoio psicológico. Aos meus irmãos, Fefe, Raquel, Ana Paula, Lucas e Iorran. Em especial minha "lmoa" e meu xodó, vocês são minha luz, minha saudade nos finais de semana de trabalho, meu refúgio de amor. Ao meu sobrinho e afilhado João Antonio, meu monstinho, que diz com orgulho que a dinda trabalha "brincando com os ratinhos". À minha sobrinha Luíza, minha neguinha, que insiste em dizer que "ratinhos não brincam com panelinhas", e a nova e linda Lala. Vocês demostram que a riqueza da vida está nos abraços quentes e nos sorrisos carinhosos. A vocês agradeço todo o suporte e carinho que me proporcionaram seguir esse caminho.

Às minhas avós, que por mais diferentes que possam ser uma da outra, tem em comum o amor que sentem por mim. Vovó Lúcia e Vovó Neta, obrigada por toda preocupação, orações, incentivos, carinho e compreensão.

À minha orientadora Ana Paula. Você fez por mim muito mais do que se espera de uma orientadora, demonstrando amizade e compreensão. A você agradeço todo suporte científico, pessoal e emocional. Agradeço por todo o exemplo de ética, compromisso, pensamento crítico e organização, e por saber me acalmar nos momentos de ansiedade e desespero. Obrigada pela confiança e por acreditar em mim.

Ao professor Athelson Bittencourt, agradeço por todo o suporte de espaço, materiais e equipamentos. Também agradeço ao carinho e o envolvimento nos projetos desde a graduação, por atuar como modificador da minha realidade. Agradeço pelo incentivo, oportunidade de trabalho e por tantas

palavras de apoio quando foram necessárias. Serei eternamente grata a você e a Ana por tantas oportunidades e por tanto carinho.

Aos colegas de laboratório, Josefa, Ludhielle, Victor Hugo, Lucas, Marcelo e Martielo, que auxiliaram na execução do projeto. Vocês garantiram muitos aniversários surpresa e que os experimentos tivessem companhia e muita alegria. Quem não se lembra das caixas de fêmeas grávidas impossíveis de serem trocadas?! Vocês me ensinaram a cuidar com amor das pessoas que me ajudam, a ter atenção diferenciada a cada um, e proporcionaram a primeira experiência de orientação. A vocês muito obrigada!

Ao querido Mart, agradeço por todo companheirismo e por toda amizade, desde a seleção do mestrado até a finalização da dissertação. Não tenho palavras para agradecer sua disponibilidade e seu companheirismo. Obrigada pela cumplicidade, pela ajuda nos experimentos sem fim, pelos problemas que ajudou a solucionar e por aturar todo meu desespero desde sempre. Não chegaria até aqui sem seu apoio.

Ao João Paulo, meu namorado, agradeço por todo amor, carinho e dedicação e por ter me incentivado nos momentos mais difíceis, fazendo questão de mostrar que eu era capaz e que sabia as respostas para as minhas perguntas. Fez questão de entender meu trabalho para me ajudar e tentou ao máximo me auxiliar com experimentos, mesmo quando seus sentimentos de biólogo falavam mais alto.

Aos amigos do Museu de Ciências da Vida. Em especial à Laíssa e ao Yuri, que são amigos para todos os momentos, e que auxiliaram em momentos de consertos, empréstimos e mudanças. Agradeço pela paciência e disponibilidade. Vocês são presentes do MCV que levarei para sempre comigo.

Agradeço aos meus queridos amigos. Em especial a Raísa, minha amiga de sempre e para sempre, por todo suporte psicológico em momentos que não acreditava em mim. Para Jéssica “Chefe” Duarte, a Juju, a Laísa, a Jéssica Pessanha e ao Jonathan, obrigado pelo incentivo e carinho. E aos queridos Julio Cesar, Aline, Pedro, e Jesus, pelo carinho e saídas que proporcionam diversão e sorrisos por tantos anos. Agradeço a compreensão e o incentivo de cada um de vocês.

Aos colegas de laboratório, Victor Curty e a Bruna Brun, pelos cafés, conselhos e preocupações. Obrigada por toda a preocupação e por me tranquilizarem nas horas em que as coisas erradas pareciam não ter fim.

À Kelly, agradeço o carinho e disponibilidade de sempre, e por atuar não somente como secretária, mas como amiga em momentos de desespero!

Aos colegas de turma agradeço o carinho e por entrarem de cabeça nas ideias dos cursos de férias.

Ao Biotério Central do Centro de Ciências da Saúde da UFES pelo apoio na execução do projeto, e em especial ao Rodolfo e ao João, que me proporcionaram auxílio e aprendizado em momentos que as tarefas exigiam demais.

Aos professores da PPGBF agradeço a disponibilidade e suporte.

Ao Marcelo Lugon, agradeço a disponibilidade e aos materiais, a atenção e por sempre tirar dúvidas que foram surgindo no caminho.

Ao professor Valério Garrone Baraúna, pelo auxílio com a execução da técnica de PCR. Obrigada pela paciência em todos os momentos que eu cheguei desesperada a sua porta!

Aos professores Luiz Carlos Schenberg, Livia Carla de Melo e Vanessa Beijamini, pelo auxílio com materiais, equipamentos e pela disponibilidade sempre.

As professoras Vanessa Beijamini e Jeyce Willig Quintino dos Santos, por aceitarem avaliar esse trabalho.

Ao Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares (LABIOM), em especial a Caroline O. Maia, a Natércia C. Alves e ao Alexandre M. C. Santos pelo auxílio e suporte com as análises moleculares.

À Universidade Federal do Espírito Santo pela estrutura.

À CAPES pela bolsa, ao CNPQ, ao ProExt MEC, e à FAPES pelo recurso financeiro.

A todos aqueles que me ajudaram de forma direta e indireta, muito obrigada!

## RESUMO

A relação entre mãe e filhote apresenta um papel de extrema importância para mamíferos, dado a importância do cuidado e da aproximação materna nos primeiros dias de vida. Eventos traumáticos nesse período podem prejudicar o desenvolvimento fisiológico e psicológico dos filhotes, podendo causar alterações em curto e longo prazo. A privação materna (PM) é um protocolo bem estabelecido e utilizado para investigar alterações tanto neurobiológicas quanto comportamentais, como os transtornos de ansiedade. Ao mesmo tempo, vem sendo demonstrado que protocolos de enriquecimento ambiental (EA) promovem numerosos benefícios sensoriais, motores e cognitivos em animais de laboratório, podendo ser utilizado na tentativa de intervir em alterações provocadas por eventos adversos pós-natais e prevenir a ocorrência de transtornos psiquiátricos na idade adulta. Nesse contexto, buscamos avaliar as implicações do enriquecimento ambiental como estratégia para prevenção dos efeitos provocados pela privação materna sobre comportamentos de ansiedade e sobre a expressão gênica de componentes do sistema serotoninérgico. Para tanto, ratos Wistar machos foram privados da presença materna durante dois períodos de 24 horas, nos dias pós-natal (DPN) 11 e 13. Os animais não privados foram mantidos sob mínimas condições de manipulação. Após o desmame, no DPN 21, esses animais foram submetidos ao enriquecimento ambiental ou a condições padrão de alojamento, assim permanecendo até o início da idade adulta. No DPN 60 foram iniciados os testes comportamentais de ansiedade, sendo eles: labirinto em T elevado (LTE), campo aberto (CA), teste de odor de predador (TOP); e teste de memória aversiva, o teste de esquia inibitória. Ao final dos testes comportamentais, os animais foram eutanasiados para obtenção das estruturas amígdala e núcleo dorsal da rafe. A expressão de mRNA dos componentes do sistema serotoninérgico: 5-HT1A, 5-HT2A, 5-HT2C, SERT e TPH2, foram avaliados em ambas as estruturas. Observamos no LTE que a PM aumentou o tempo de esquia 1, enquanto o enriquecimento aumentou o tempo de esquia 2, sem alterações relacionadas a fuga. A PM não provocou mudanças no CA, mas o EA diminuiu a atividade locomotora em todos os parâmetros avaliados. A PM também não provocou alterações no TOP, entretanto o EA causou diminuição do tempo no compartimento escondido e aumento do tempo



de investigação da fonte do odor. Nenhuma das condições provocou alteração no teste de esquiva inibitória. Além disso, nem a PM, nem o EA provocaram alterações na expressão de mRNA de componentes do sistema serotoninérgico na amígdala e no núcleo dorsal da rafe. Podemos concluir que ambas as condições provocam efeitos ansiogênicos sem alterar a memória aversiva, mas apenas o EA altera a resposta a novos ambientes e contextos, e apesar do notório envolvimento da rafe dorsal e da amígdala com a ansiedade, a neurotransmissão serotoninérgica nestas estruturas não é alterada pela privação maternal e pelo enriquecimento ambiental.

Palavras-chave: Privação maternal. Ansiedade. Enriquecimento ambiental. Sistema serotoninérgico.

## **ABSTRACT**

The relationship between mother and its pups is extremely important for mammals, given the importance of maternal care and attachment in the first days of life. Traumatic events during this period may impair physiological and psychological development, potentially causing short- and long-term changes. Maternal deprivation (MD) is a well-established protocol used to investigate both neurobiological and behavioral changes such as anxiety disorders. It has been demonstrated that environmental enrichment (EE) protocols promote numerous sensory, motor, and cognitive benefits in laboratory animals, and may be used to intervene in changes caused by postnatal adverse events and to prevent the occurrence of psychiatric disorders in adulthood. In this context, we evaluated the implications of EE as a strategy to prevent the maternal deprivation effects on anxiety behaviors and gene expression of the serotonergic system components. Male Wistar rats were deprived of maternal presence during two 24-hour periods on 11<sup>th</sup> and 13<sup>th</sup> postnatal days (PND). Non-deprived animals were kept under minimal manipulation conditions. In 21<sup>th</sup> PND, after weaning, the animals were submitted to EE or standard housing conditions, and there remained until early adulthood. In 60<sup>th</sup> PND, we initiated the behavioral anxiety tests: T-maze test, open field (OF), predator odor test (POT); and inhibitory avoidance test. After that, the animals were euthanized to obtain the amygdala and dorsal raphe nucleus. mRNA expression of the serotonergic system components (5-HT<sub>1A</sub>R, 5-HT<sub>2A</sub>R, 5-HT<sub>2C</sub>R, SERT and TPH<sub>2</sub>) were evaluated in both structures. We observed in the T-maze that the MD increased the avoidance time 1, while the enrichment increased the avoidance time 2, without changes in escape latencies. MD did not cause changes in OF, but EE decreased the locomotor activity in all evaluated parameters. MD also did not altered behavior in the POT, but EE decreased the time in the hidden compartment and increased the investigation of the odor source. None of the treatments caused changes in the inhibitory avoidance test. Neither MD nor EE caused changes in mRNA expression of serotonergic system components in the amygdala and dorsal raphe nucleus. We can conclude that both treatments induce anxiogenic effects without altering aversive memory, but just EE alters the response to new environments and contexts. Despite the well established involvement of dorsal raphe and amygdala

with anxiety, the serotonergic neurotransmission in these structures is not altered by maternal deprivation or environmental enrichment.

Keywords: Maternal deprivation. Anxiety. Environmental enrichment. Serotonergic system.

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

### REVISÃO DE LITERATURA

<b>Figura 1:</b> Síntese de serotonina .....	32
<b>Figura 2:</b> Síntese e degradação de serotonina.....	33
<b>Figura 3:</b> Condições de moradia de ambientes de habitação padrão comparado com ambientes enriquecidos.....	37

### ARTIGO

<b>Figura 1:</b> Desenho experimental.....	48
<b>Figura 2:</b> Caixa de privação maternal. ....	48
<b>Figura 3:</b> Caixa de enriquecimento ambiental. ....	49
<b>Figura 4:</b> Labirinto em T elevado. ....	50
<b>Figura 5:</b> Esquema do aparato para o teste de odor de predador.....	52
<b>Figura 6:</b> Efeito da privação maternal e do enriquecimento ambiental sobre o comportamento no labirinto em T elevado.....	56
<b>Figura 7:</b> Efeito da privação maternal e do enriquecimento ambiental no teste do campo aberto, nos comportamentos de distância total percorrida, distância percorrida periferia do aparato e distância percorrida periferia do aparato.....	57
<b>Figura 8:</b> Efeito da privação maternal e do enriquecimento ambiental no teste do odor de predador.....	59
<b>Figura 9:</b> Efeito da privação maternal e do enriquecimento ambiental no teste de esQUIVA inibitória.....	60
<b>Figura 10:</b> Efeito da privação maternal e do enriquecimento ambiental sobre a expressão de mRNA dos receptores do sistema serotoninérgico na amígdala..	61
<b>Figura 11:</b> Efeito da privação maternal e do enriquecimento ambiental sobre a expressão de mRNA do transportador de serotonina e da enzima triptofano hidroxilase na amígdala.....	62
<b>Figura 12:</b> Efeito da privação maternal e do enriquecimento ambiental sobre a expressão de mRNA dos receptores do sistema serotoninérgico no núcleo dorsal da rafe.....	62
<b>Figura 13:</b> Efeito da privação maternal e do enriquecimento ambiental sobre a expressão de mRNA do transportador de serotonina e da enzima triptofano hidroxilase no núcleo dorsal da rafe.....	62

### TABELAS

<b>TABELA 1</b> Sequências de iniciadores utilizadas por gene.....	54
--	----

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

### **REVISÃO DE LITERATURA**

2-AG: 2-araquidonil glicerol

5-HT: serotonina ou 5-hidroxitriptamina

5-HT<sub>1A</sub>: receptor serotoninérgico

5-HT<sub>2A</sub>: receptor serotoninérgico

5-HT<sub>2C</sub>: receptor serotoninérgico

5-HT<sub>3</sub>: receptor serotoninérgico

ACTH: hormônio adrenocorticotrófico

DPN: dias pós-natal

DSM: Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais

EA: enriquecimento ambiental

GABA: ácido gama-aminobutírico

HHA: eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

LCE: labirinto em cruz elevado

NPH: núcleo paraventricular do hipotálamo

OMS: organização mundial de saúde

PM 11 e 13: privação maternal nos dias pós-natal 11 e 13

PM 9 e 11: privação maternal nos dias pós-natal 9 e 11

PM: privação maternal

RG: receptor de glicocorticóides

SCPA: substância cinzenta periaquedutal

SERT: transportador de serotonina

SM: separação maternal

SNC: sistema nervoso central

TPH: enzima triptofano hidroxilase

TPH1: enzima triptofano hidroxilase identificada em tecidos extraneuronais

TPH2: enzima triptofano hidroxilase presente principalmente no SNC

VMAT: transportador de monoaminas vesicular

## LISTA DE ABREVIATURAS

### ARTIGO

5-HT: serotonina ou 5-hidroxitriptamina

5-HT<sub>1A</sub>: receptor serotoninérgico

5-HT<sub>2A</sub>: receptor serotoninérgico

5-HT<sub>2C</sub>: receptor serotoninérgico

ACTH: hormônio adrenocorticotrófico

ANOVA: análise de variância

CA: teste do Campo Aberto

cDNA: DNA complementar

DEPC: água deionizada, previamente tratada com dietilpirocarbonato

DPN: dia pós-natal

DSM: Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais

EA: enriquecimento ambiental

GABA: ácido gama-aminobutírico

GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato

HHA: eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

LCE: labirinto em cruz elevado

LTE: teste do Labirinto em T Elevado

mRNA: ácido ribonucleico mensageiro

PCR: proteína C reativa

PM 11 e 13: privação maternal nos dias pós-natal 11 e 13

PM 9 e 11: privação maternal nos dias pós-natal 9 e 11

PM: privação maternal

SCPA: substância cinzenta periaquedutal

SERT: transportador de serotonina

SNC: sistema nervoso central

TAE: Tris-ácido acético EDTA

TOP: teste de Odor de predador

TPH: enzima triptofano hidroxilase

TPH2: enzima triptofano hidroxilase presente principalmente no SNC



## SUMÁRIO

<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	20
1. Relação de apego entre mãe e filhote	20
2. Desenvolvimento do sistema nervoso	21
3. Estresse neonatal	22
3.1 - <i>Privação maternal</i>	22
3.2 - <i>Consequências comportamentais da privação maternal</i>	24
3.3 - <i>Consequências neuroquímicas da privação maternal</i>	26
4. Transtornos de ansiedade	29
5. Neurotransmissão serotoninérgica	31
6. Papel da Serotonina nos Transtornos de Ansiedade	33
7. Tratamento dos transtornos de ansiedade	35
8. Enriquecimento ambiental	36
<b>OBJETIVOS</b>	39
Objetivo Geral	39
Objetivos Específicos	39
<b>ARTIGO CIENTÍFICO</b>	41
1. INTRODUÇÃO	44
2. MÉTODOS	47
2.1. Animais Experimentais	47
2.2. Desenho experimental	47
2.3. Privação Maternal	48
2.4. Enriquecimento Ambiental	49
2.5. Testes Comportamentais	49
2.5.1. <i>Labirinto em T elevado</i>	49
2.5.2. <i>Teste do Campo Aberto</i>	50
2.5.3. <i>Teste do Odor do Predador</i>	51
2.5.4. <i>Teste de esquiva inibitória</i>	52
2.6. Eutanásia e obtenção das amostras	52
2.7. Análise da expressão gênica	53
2.7.1. <i>Extração de RNA total</i>	53
2.7.2. <i>Eletrofose em gel de agarose</i>	53
2.7.3. <i>Síntese de cDNA</i>	54
2.7.4. <i>Reação de PCR em tempo real</i>	54
2.8. Análise Estatística	55

3. RESULTADOS .....	55
3.1. Labirinto em T elevado .....	55
3.1.1. <i>Esquiva Inibitória</i> .....	55
3.1.2. <i>Fuga</i> .....	56
3.2. Teste do Campo Aberto .....	56
3.1. Teste do Odor de Predador .....	58
3.1.1. <i>Tempo no Compartimento Escondido</i> .....	58
3.1.2. <i>Tempo de investigação do pano</i> .....	58
3.2. Teste de Esquiva Inibitória.....	59
3.3. Expressão de mRNA de componentes do sistema serotoninérgico na amígdala .....	60
3.4. Expressão de mRNA de componentes do sistema serotoninérgico no núcleo dorsal da rafe .....	61
4. DISCUSSÃO .....	63
5. CONCLUSÕES .....	81
6. CONFLITO DE INTERESSES .....	72
7. AGRADECIMENTOS.....	72
8. REFERÊNCIAS .....	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	84
APÊNDICE .....	99

*Revisão de Literatura*

## REVISÃO DA LITERATURA

### 1. Relação de apego entre mãe e filhote

As experiências dos primeiros anos de vida são determinantes para o desenvolvimento psicológico, fisiológico e social dos indivíduos, sendo as relações parentais, principalmente entre as mães e seus filhotes, importantíssimas para esse desenvolvimento. A relação entre mãe e filhote, em humanos e outras espécies de mamíferos, possibilita o desenvolvimento e sobrevivência do recém-nascido, apresentando a função evolutiva de proteção e, fornecimento de calor e alimento ao filhote (SULLIVAN, 2003).

O psiquiatra inglês John Bowlby dedicou-se a estudar os efeitos do cuidado materno sobre crianças em seus primeiros anos de vida, e evidenciou os efeitos adversos ao desenvolvimento atribuídos ao rompimento na interação com a figura materna durante a primeira infância. Em suas obras, Bowlby relata que o relacionamento da criança com os pais é instaurado através da resposta destes aos primeiros sinais inatos realizados pelos bebês, que demandam proximidade. Ao longo do tempo, um vínculo afetivo se desenvolve devido tanto ao desenvolvimento da capacidade cognitiva e emocional do bebê quanto aos procedimentos de cuidado e responsividade dos cuidadores. Esse cuidado recebido forma uma das ideias centrais da teoria do apego, de que as primeiras relações estabelecidas na infância afetam o estilo de apego do indivíduo ao longo de sua vida (BOWBLY, 1982).

Na prática clínica, a importância da aproximação entre mãe e bebê é exemplificada pelo Método Canguru. Esse método foi inicialmente proposto na Colômbia, no Instituto Materno Infantil de Bogotá, como proposta de melhorar os cuidados prestados ao recém-nascido pré-termo naquele país, visando reduzir os custos da assistência perinatal e promover o desenvolvimento do neonato (REY & MARTINEZ, 1983). Atualmente, no Brasil, a aplicação do Método Canguru é iniciada quando existe a necessidade de permanência do neonato em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal. Nesse caso, os pais são estimulados a

entrar nesses locais e estabelecer contato pele a pele com o bebê, de forma gradual e crescente, de maneira segura e agradável para ambos.

O Método Canguru é um modelo de assistência perinatal voltado para a melhoria da qualidade do cuidado. Esse método reduz o tempo de separação entre mãe e recém-nascido e favorece o vínculo entre eles, o que permite um controle térmico adequado, contribui para a redução do risco de infecção hospitalar, reduz o estresse e a dor do recém-nascido, aumenta as taxas de aleitamento materno e melhora a qualidade do desenvolvimento neurocomportamental e psico-afetivo do recém-nascido (CHARPAK et al., 1997; TESSIER et al., 1998; WORKU & KASSIE, 2005).

Em modelos animais, a importância do cuidado materno é demonstrada por estudos de estimulação neonatal (*handling*). A estimulação neonatal consiste em separar as mães dos filhotes por poucos minutos, o que aumenta o tempo de cuidado dos filhotes quando estes retornam ao contato com a mãe. O maior cuidado das mães, com aumento no número de lambidas e maior interação com o filhote, melhora o desenvolvimento de estruturas encefálicas, o desempenho em tarefas cognitivas, e causa menor reatividade ao estresse na vida adulta (LIU et al., 1997; LIU et al., 2000; MEANEY, 2001).

## **2. Desenvolvimento do sistema nervoso**

O período perinatal corresponde a um período extremamente delicado para o desenvolvimento de filhotes, visto que nessa fase diversos sistemas continuam seu processo de maturação, em especial o sistema nervoso central (SNC) (DUBOIS et al., 2014). A etapa mais vulnerável para o desenvolvimento do SNC, chamado de “período crítico de crescimento cerebral”, consiste no período de pico de atividade de eventos específicos, nos quais ocorre os processos de neurogliogênese, migração e diferenciação celular. Nos seres humanos esse período vai do terceiro trimestre da gestação até o segundo ou terceiro ano de vida, e em ratos desde o nascimento até o fim do aleitamento (pós-natal), em torno do 21º dia (DOBBING, 1968; MORGANE et al., 2002).

O cérebro não é um órgão homogêneo, e por ser formado por várias estruturas e regiões, cada uma possui seu ritmo de crescimento. Morgane e

colaboradores (1993) afirmam que cada região cerebral, com suas diferentes histologias, segue uma sequência de desenvolvimento temporal precisa e planejada, tendo desta forma seu próprio período crítico de crescimento. Em geral, a histogênese do SNC em todos os mamíferos é desenvolvida em três principais estágios: proliferação, migração e diferenciação. Qualquer perturbação nesses estágios de desenvolvimento poderá ocasionar prejuízos na formação de circuitos neurais (SCHMIDT et al., 2002; FAN et al., 2011).

### **3. Estresse neonatal**

Considerando a importância da aproximação e do cuidado materno no início da vida, a exposição ao estresse durante o período pós-natal, pode causar consequências duradouras para os filhotes que podem perdurar por toda a vida. Nesse contexto, o estresse neonatal consiste em um modelo experimental que mimetiza experiências traumáticas no período perinatal, como maus tratos, negligência, violência física, violência psicológica ou abandono (HEIM & NEMEROFF, 2001; SÁNCHEZ et al., 2001; LAMBAS-SEÑAS et al., 2009).

As alterações provocadas pelo estresse neonatal podem ser evidenciadas em diversos protocolos de intervenções durante este período, e podem variar desde poucos minutos de separação entre a genitora e os filhotes (a chamada manipulação neonatal), separação maternal (SM) de 3 a 6 horas diárias, ou mesmo um período contínuo de 24 horas de privação maternal (PM) (HEIM & NEMEROFF, 2001).

#### **3.1 - *Privação maternal***

A privação maternal é um protocolo bem estabelecido e utilizado para investigar alterações neurobiológicas e comportamentais, associadas com doenças relacionadas ao estresse (MARCO et al., 2015). Uma extensa literatura investiga as consequências de curto e longo prazo da privação maternal e o mecanismo pelo qual exercem seus efeitos.

Inicialmente, a PM se estabeleceu como um modelo para estudo de alterações no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal em resposta ao estresse (ROTS

et al., 1996; VAN OERS et al., 1997). Atualmente, a PM se constitui de um modelo de estresse precoce adequado para a investigação de distúrbios psiquiátricos com origens no desenvolvimento, como esquizofrenia e depressão, e como um modelo para a investigação das implicações de uma interrupção do desenvolvimento cerebral (ELLENBROEK et al., 1998; LI et al., 2009; MARCO et al., 2015).

Diferentemente dos protocolos de separação maternal, a privação maternal não se constitui apenas de um modelo de estresse de separação da mãe do filhote. Nesse modelo existe uma combinação de fatores estressores que contribuem para as alterações encontradas nesses animais. Os animais submetidos a PM permanecem por 24 horas sem cuidado materno, entretanto, ao retornarem ao contato com a mãe, recebem maior cuidado e proteção, o que por si poderia compensar os efeitos da PM (MACRI et al., 2008). Porém, somado a isso, durante o período de PM os animais sofrem déficits nutricionais que causam prejuízos para o desenvolvimento, uma vez que a falta de alimentação durante esse período contribui para a diminuição do índice glicêmico e dos níveis de leptina, resultando em alterações metabólicas e hormonais específicas (VIVEROS et al., 2010). Além disso, a diminuição da temperatura corporal, devido à falta de um sistema de regulação térmica maduro nos neonatos, também pode contribuir para os efeitos observados pela PM (ZIMMERBERG & SHARTRAND, 1992). Dessa forma, cada estressor pode atuar como um fator crucial para este modelo animal do estresse na infância.

Além dos efeitos estressores provocados pelo período longo de PM, o dia em que a privação ocorre também é considerado um fator determinante dos efeitos comportamentais por ela induzidos. Diversos autores realizam a PM em dias diferentes e observam, consequentemente, diferentes resultados. Ellenbroek e colaboradores (1998), por exemplo, compararam os efeitos da PM nos dias pós-natal 3, 6 e 9 em reações de inibição pré-pulso, habilidade comprometida em portadores de esquizofrenia. Nesse estudo, foram observados que todos os dias de PM foram capazes de provocar redução das reações de inibição pré-pulso, embora nos dias 6 e 9 os efeitos tenham sido mais visíveis. Esses autores atribuem os achados a hipótese de que a privação materna

provoca hiperatividade do sistema dopaminérgico, o que é evidenciado na clínica em pacientes esquizofrênicos.

Van Oers e colaboradores (1997), também observaram diferenças ao comparar os efeitos de diferentes dias de PM. Os autores realizaram a PM nos dias 3, 7 e 11 e avaliaram os níveis de hormônio adenocorticotrófico (ACTH) e corticosterona frente a um estímulo estressor, no 20º dia de vida, além de avaliarem os níveis de receptores de glicocorticoides (RG) no núcleo paraventricular do hipotálamo (NPH) e no hipocampo. Nesse estudo, filhotes privados no DPN 3 apresentaram maior secreção de ACTH em comparação com os demais dias de PM, enquanto filhotes privados nos DPNs 7 e 11 secretaram menos ACTH que os animais controle. Não houve diferença entre os dias de PM com relação aos níveis de corticosterona. Entretanto, foi observada uma “*downregulation*” para a expressão dos RG em todos os dias de PM no NPH, enquanto no hipocampo essa diferença foi observada apenas na PM nos DPNs 7 e 11. Esses achados são atribuídos ao período de estresse neonatal, entretanto, a magnitude desses efeitos é dependente da idade em que a privação materna é realizada. Pode-se concluir, então, que de fato o dia em que a privação maternal ocorre pode ocasionar diferentes alterações bioquímicas e comportamentais.

### **3.2 - Consequências comportamentais da privação maternal**

Diversos estudos evidenciam que a privação maternal pode induzir alterações comportamentais de curto e longo prazo. Esses efeitos ainda são controversos, e por isso são bastante abordados na literatura. Por exemplo, diferentes resultados são relatados com relação à ansiedade no teste de labirinto em cruz elevado (LCE). Em estudos com animais adolescentes, submetidos a PM no DPN 9, e posteriormente avaliados no LCE, não foram observadas alterações (LLORENTE et al., 2011; MARCO et al., 2013); entretanto, naqueles em que foram avaliados animais na idade adulta observou-se um aumento significativo no tempo gasto explorando os braços abertos do labirinto, sugerindo um efeito ansiolítico provocado pela PM (LLORENTE-BERZAL et al., 2011; BURKE et al., 2013). Por outro lado, estudos com a PM no DPN 11 indicaram



aumento de comportamentos de ansiedade, observados no teste do labirinto em cruz elevado (FATURI et al., 2010; NETO, et al., 2012).

Recentemente, em nosso grupo de estudo, observamos diferenças consideráveis nos dias em que a PM ocorre (APÊNDICE). Realizamos experimentos em que diferentes grupos de animais foram submetidos a dois períodos de PM cada, nos dias pós-natal 9 e 11 e ainda nos dias pós-natal 11 e 13. Observamos diferenças comportamentais significativas nesses dois protocolos. A PM nos dias 9 e 11 aumentou comportamentos tipo-pânico no teste do labirinto em T elevado, comportamentos que não foram alterados pela PM nos dias 11 e 13.

Além disso, dados da literatura sugerem que a atividade locomotora também pode ser dependente da idade de realização do teste e do dia em que a PM ocorre. Llorente et al. (2007). realizaram a PM no DPN 9 e observaram diminuição da atividade locomotora em animais adolescentes, avaliadas no LCE. Esses autores atribuíram esses resultados a uma redução na capacidade de lidar com situações de estresse, tais como a exposição ao labirinto. Por outro lado, Burke et al. (2013) e Rentesi et al. (2013), também realizando a PM no DPN 9, observam aumento da atividade locomotora em animais adultos. Pouco tempo atrás, observamos que dois dias de PM, nos DPNs 9 e 11 e nos DPNs 11 e 13, alteram de forma diferenciada o comportamento de animais adultos no teste do campo aberto. Nossos resultados demonstraram que a PM nos dias 11 e 13 aumentou a distância total percorrida e a distância percorrida na periferia, quando comparado a animais controle e animais PM nos dias 9 e 11 (APÊNDICE). Esses comportamentos podem estar relacionados a agitação psicomotora observada em distúrbios neuropsiquiátricos, como déficit de atenção e hiperatividade, transtorno bipolar ou, ainda, esquizofrenia (POWELL & MIYAKAWA, 2006).

Portanto, existem resultados controversos com relação a ansiedade e atividade locomotora, o que pode estar relacionado com o dia em que a PM materna ocorre, e também com a idade em que os testes são realizados. Esses resultados estão possivelmente relacionados a alterações específicas em sistemas encefálicos responsáveis por esses comportamentos.

### **3.3 - Consequências neuroquímicas da privação maternal**

Estudos indicam que um único episódio de PM é capaz de modificar o peso corporal e o estado energético de animais, induzindo redução duradoura no peso corporal de machos e fêmeas durante a infância, adolescência e até o início da idade adulta (ELLENBROEK et al., 2005, LLORENTE et al., 2007, MARCO et al., 2013, BURKE et al., 2013). Corroborando esses resultados, recentemente observamos que dois dias da PM, nos dias pós-natal 9 e 11 e também nos dias pós-natal 11 e 13, alteram o peso corporal, quando comparado a animais controle e animais submetidos ao estresse de separação maternal, até o início da idade adulta, (Lima, R. M. L. dados não publicados). Além disso, estudos indicam que a PM reduz drasticamente os níveis de leptina circulante (VIVEROS et al., 2010), ao mesmo tempo que estudos sugerem que a PM causa uma diminuição na ingestão de alimentos (MELA et al., 2012).

Em roedores, a separação de um filhote de sua mãe aumenta as respostas comportamentais e endócrinas ao estresse, e os efeitos induzidos pela PM podem resultar, pelo menos em parte, do aumento nos níveis de glicocorticoides induzidos pelo evento de separação (MARCO et al., 2015).

O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) controla as respostas do organismo ao estresse. O hormônio liberador de corticotrofina (CRH), principal regulador do eixo HHA, é produzido no núcleo paraventricular do hipotálamo e liberado na circulação portal hipofisária, atuando sobre a hipófise anterior. A ligação do CRH em seus receptores induz a liberação de ACTH. O ACTH, por sua vez, estimula a síntese e liberação de corticosterona (CORT) na supra-renal de ratos (SMITH & VALE, 2006). Entretanto, durante as duas primeiras semanas de vida, existe um período de hiporresponsividade ao estresse, ou seja, um período de baixa resposta da glândula adrenal para a produção de glicocorticoides, o que garante o desenvolvimento adequado do sistema nervoso central (SAPOLSKY & MEANEY, 1986). Eventos estressantes, como a privação maternal, podem desinibir o eixo HHA, elevando a corticosterona, o que pode provocar mudanças duradouras no SNC desses animais, principalmente no controle do eixo HHA (OITZL et al., 2010; LAJUD et al., 2012).

A hiperatividade do eixo HHA está relacionada diversas alterações de longo prazo, como o aumento dos níveis plasmáticos de ACTH e de corticosterona em resposta a estímulos estressores (LEVINE et al., 2001; LLORENTE et al., 2008; VIVEROS et al., 2010), além de ter sido associada a doenças como a depressão, dada a observação de fenótipo depressivo no teste de nado forçado tanto em animais adolescentes quando em adultos (LLORENTE et al., 2007; ZAMBERLETTI et al., 2012).

Além disso, a PM foi inicialmente considerada como um modelo para a investigação da esquizofrenia, muitos estudos focaram nos efeitos da PM na neurotransmissão dopaminérgica, e observaram que o sistema dopaminérgico mesolímbico pode, pelo menos em parte, mediar os resultados eliciados pela PM (ELLENBROEK & COOLS, 2000; ELLENBROEK et al., 2005). Estudos recentes observaram aumento no *turnover* de dopamina em áreas como estriado, córtex pré-frontal e amígdala em animais submetidos a PM, o que pode causar alterações na atividade locomotora e também na impulsividade (RENTESI et al., 2013). Além disso, Ellenbroek e Cools (2000) observaram que animais adultos apresentam vulnerabilidade aos efeitos de agentes dopaminérgicos, como apomorfina e anfetamina.

Além de alterações no peso corporal, na resposta ao estresse e no sistema dopaminérgico, estudos vêm demonstrando que a PM no dia pós-natal 13 é capaz de provocar alterações específicas no desenvolvimento do sistema endocanabinóide, como aumento do 2-araquidonil glicerol (2-AG), alteração na expressão de enzimas responsáveis pela síntese ou degradação de 2-AG, além de diminuição da expressão do receptor hipocampal CB1 nesses animais (LLORENTE et al., 2008; MARCO et al., 2011). Ao mesmo tempo, estudos indicam um aumento nos níveis de expressão do receptor CB2 (SUÁREZ, et al., 2009; SUÁREZ, et al., 2010). O sistema endocanabinóide modula diversas funções cerebrais, que incluem ansiedade, medo e humor, atuando através de sua liberação em neurônios pós-sinápticos, que reagem a liberação de neurotransmissores clássicos em terminais pré-sinápticos (MOREIRA & LUTZ, 2008), o que também poderia estar contribuindo para as alterações comportamentais e em outros sistemas encefálicos, encontradas em estudos com a privação maternal.

Com relação ao sistema serotoninérgico, os resultados ainda são controversos, Rentesi et al (2010), por exemplo, realizaram PM no DPN 9 e avaliaram, na idade adulta, os níveis de corticosterona e ACTH, atividade serotoninérgica no hipocampo e no hipotálamo, além de comportamentos relacionados a ansiedade. Nesse estudo, os autores observaram que a PM provocou diminuição do peso corporal, aumento da atividade serotoninérgica no hipotálamo, dos níveis plasmáticos de corticosterona e ACTH, bem como de comportamentos relacionados à ansiedade. De fato, a redução do peso corporal está diretamente relacionada ao aumento da atividade serotoninérgica hipotalâmica, uma vez que essa desempenha um importante papel no controle da ingesta alimentar. Além disso, o aumento da atividade serotoninérgica no hipocampo, somado aos níveis de CORT e ACTH podem contribuir para o desenvolvimento de transtornos de ansiedade na idade adulta.

Rentesi et al (2013) também avaliaram os níveis de serotonina e seus metabólitos no córtex pré-frontal, amígdala e estriado, em animais adultos que foram submetidos a PM no DPN 9, e observaram uma diminuição no conteúdo de serotonina (5-HT) no córtex pré-frontal e na amígdala, ao mesmo tempo em que houve diminuição da expressão do receptor 5-HT<sub>2A</sub> no corpo estriado e aumento na amígdala. Em contraste, Llorente et al. (2010) avaliaram os efeitos do PM nos níveis de serotonina no córtex pré-frontal, hipocampo, estriado, mesencéfalo e cerebelo de animais adolescentes, e observaram aumento dos níveis de 5-HT em todas as regiões estudadas, com exceção do cerebelo. Esses achados corroboram os resultados encontrados em comportamentos relacionados à ansiedade.

De acordo com o acima exposto, é possível observar uma ampla gama de resultados relacionados aos efeitos de longo prazo da PM no DPN 9. Sabendo que as duas primeiras semanas de vida são extremamente delicadas para filhotes, a PM realizada em outros dias desse período pode potencialmente provocar alterações duradouras, sendo estes, portanto, possíveis alvos de investigação.

Além disso, resultados prévios de estudos pilotos em nosso laboratório, (APÊNDICE), demonstram que a associação de dois dias de PM, nos DPNs 11

e 13, podem causar alterações específicas na esquiva inibitória, no teste do labirinto em T elevado, e na atividade locomotora, no teste do campo aberto. Sendo assim, a PM realizada nos DPNs 11 e 13 constitui um alvo interessante para a investigação dos efeitos neuroquímicos e comportamentais do estresse neonatal.

#### **4. Transtornos de ansiedade**

A ansiedade pode ser definida como um estado emocional subjetivo de apreensão ou tensão, cuja manifestação pode envolver alterações comportamentais e fisiológicas, como taquicardia, sudorese, tensão muscular, irritabilidade inquietação e perturbação do sono (BRANDÃO, 2001; GRAEFF, 1999). Sabe-se que ansiedade se constitui como uma emoção presente no cotidiano, que favorece o desempenho do indivíduo em suas atividades diárias. Entretanto, pode assumir um caráter patológico quando ocorre de maneira exacerbada, podendo comprometer ou incapacitar a execução de atividades psíquicas e ou motoras (BRANDÃO, 2001; GRAEFF, 2004).

Os transtornos de ansiedade incluem transtornos que compartilham características de medo e ansiedade excessivos e perturbações comportamentais relacionados a eles. O medo é a resposta emocional a ameaça iminente real ou percebida, enquanto ansiedade, por sua vez, é considerada como a antecipação de uma ameaça futura. De fato, esses dois estados se sobrepõem, porém existem diferença entre eles. O medo é associado a períodos de excitabilidade autonômica aumentada, necessária para luta ou fuga, pensamentos de perigo imediato e comportamentos de fuga, enquanto a ansiedade é mais frequentemente associada à tensão muscular e vigilância em preparação para perigo futuro e comportamentos de cautela ou esquiva (DSM-V, 2013).

Os transtornos de ansiedade se diferenciam do medo ou da ansiedade adaptativos por serem excessivos ou persistirem além de períodos apropriados ao nível de desenvolvimento. Segundo a classificação mais recente dos transtornos mentais publicada na quinta edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM), os transtornos de ansiedade podem ser agrupados nas seguintes categorias:

- Transtorno de ansiedade de separação;
- Mutismo seletivo;
- Fobia específica e social;
- Transtorno do pânico;
- Agorafobia;
- Distúrbios de ansiedade generalizada.

São de interesse especial para o presente trabalho a ansiedade generalizada e o transtorno de pânico. O transtorno de ansiedade generalizada é classificado como um estado de excessiva ansiedade ou apreensão com duração de mais de seis meses, e acompanhado dos sintomas de inquietação, fadiga, dificuldade de concentração, irritabilidade, tensão muscular e/ou perturbações do sono. Segundo o DSM-V, a intensidade, duração ou frequência da ansiedade e preocupação é desproporcional à probabilidade real ou ao impacto do evento antecipado.

O transtorno de pânico, por sua vez, é caracterizado por ataques de pânico recorrentes e inesperados, com surtos abruptos de medo ou desconforto intenso durante o qual ocorrem sintomas como palpitações, taquicardia, sudorese, sensações de falta de ar ou sufocamento, e medo de morrer. Um ataque de pânico é considerado como um surto abrupto de medo ou desconforto intenso, que alcança um pico em minutos e durante o qual ocorrem os sintomas supracitados. Os ataques pânico podem ocorrer de modo inesperado ou esperado. O termo inesperado está relacionado ao fato de um ataque de pânico ocorrer sem um indício ou desencadeante óbvio. Em contraste, os ataques de pânico esperados são ataques para os quais existe um indício ou desencadeante óbvio, como uma situação em que os ataques de pânico ocorrem geralmente (DSM-V, 2013).

Dados epidemiológicos da Organização Mundial de Saúde mostram que, em alguns países, como o Brasil, Canadá, Holanda e Turquia, o transtorno de ansiedade é mais prevalente do que os transtornos de humor e abuso de drogas (WHO, 2000). Outro estudo, reunindo dados epidemiológicos de 24 países, apontou que cerca 30% dos habitantes da Região Metropolitana de São Paulo apresentam transtornos mentais, sendo essa prevalência a mais alta registrada

em todas as áreas pesquisadas. Os transtornos de ansiedade foram os mais comuns, afetando 19,9% dos entrevistados (KESSLER & USTUN, 2008; ANDRADE et al., 2012).

Muitos esforços têm sido empregados na tentativa de compreender os componentes neuroquímicos envolvidos nos transtornos da ansiedade, já que várias substâncias neurotransmissoras têm sido relacionadas à mediação ou modulação da expressão de comportamentos de defesa, como o ácido gama-aminobutírico (GABA), o glutamato e a serotonina. A serotonina, por exemplo, vem sendo relacionada a modulação desses comportamentos, principalmente porque compostos que inibem sua recaptação são eficazes no tratamento de ansiedade generalizada e transtorno de pânico (para revisão ver GRAEFF & ZANGROSSI, 2010).

## **5. Neurotransmissão serotoninérgica**

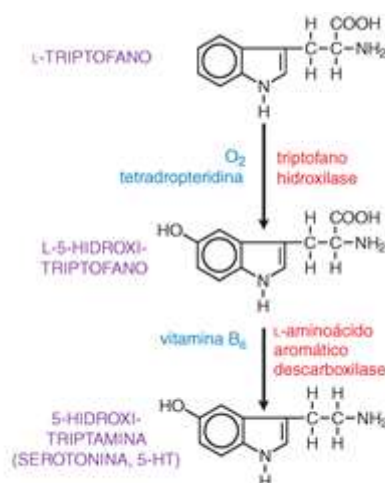
A serotonina, ou 5-hidroxitriptamina (5-HT), é um neurotransmissor, pertencente à classe de indolaminas que está envolvida na regulação de uma ampla variedade de funções fisiológicas, tanto no sistema nervoso quanto em outros sistemas periféricos. No sistema nervoso central, a 5-HT está relacionada com a modulação do humor, sede, fome, sono e da temperatura corporal. Desta forma, alterações na sua homeostase estão relacionadas a uma série de condições fisiopatológicas (JACOBS & AZMITIA, 1992).

A 5-HT foi descoberta por Vittorio Erspamer em trabalhos realizados na década de 30, que relacionavam substâncias provenientes das células enterocromafins do intestino de diversas espécies animais. Esta substância foi chamada inicialmente de enteramina, e tinha a capacidade de aumentar o tônus da musculatura lisa. Posteriormente, Rapport e colaboradores (1948) identificaram uma substância no soro bovino também com propriedade de aumentar o tônus muscular liso, e denominaram-na serotonina. Mais tarde, essas duas substâncias foram identificadas como sendo a 5-hidroxitriptamina, concluindo que era a mesma substância (ERSPAMER & ASERO, 1952). Em 1953, Twarog & Page descobriram que a serotonina atuava como um mediador

químico no sistema nervoso central após identificarem a presença desta substância em extratos de tecido cerebral de ratos e coelhos.

A 5-HT é sintetizada a partir da hidroxilação do aminoácido essencial L-triptofano pela enzima triptofano hidroxilase (TPH), originando o composto 5-hidroxi-L-triptofano (figura 1), etapa limitante da reação. A seguir, a L-aminoácido aromático descarboxilase converte o 5-hidroxitriptofano em 5-HT. A 5-HT é concentrada e armazenada no interior de vesículas localizadas nos axônios, corpos celulares e dendritos, e liberada quando necessário (para uma revisão, ver FRAZER & HENSLER, 1999).

A enzima TPH é regulada por retroalimentação inibitória através de auto-receptores. Foram identificadas duas isoformas envolvidas na síntese de 5-HT, a TPH1, identificada em tecidos extraneuronais e TPH2, presente principalmente no SNC (WALTHER, PETER, BASHAMMAKH et al., 2003). A formação da 5-HT é limitada às células que contém a enzima TPH, ou seja, plaquetas, células enterocromafins, e grupos de neurônios encefálicos localizados principalmente na ponte e no mesencéfalo, organizados em conjuntos denominados de núcleos da rafe (DAHLSTROM & FUXE, 1964; HAGEN & COHEN, 1966; TYCE, 1990).

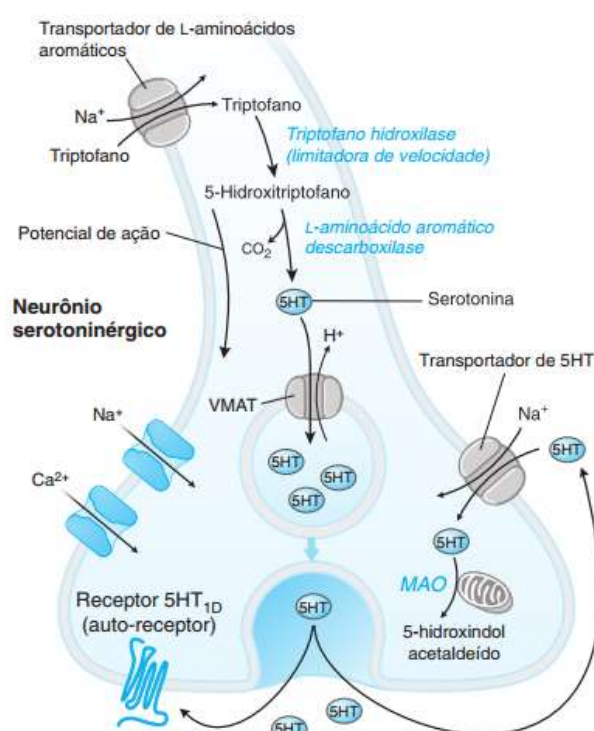


**Figura 1:** Síntese de serotonina (adaptado de Goodman & Gilman, 12ª edição).

Após sua síntese, a 5-HT é transportada para vesículas sinápticas por intermédio do transportador de monoaminas vesicular (VMAT, sigla do inglês “vesicular monoamine transporter”), um transportador inespecífico de



monoaminas (WIMALASENA, 2011). A neurotransmissão é iniciada por um potencial de ação no neurônio pré-sináptico, que provoca a fusão das vesículas sinápticas com a membrana plasmática através de um processo dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Por fim, a 5-HT é reciclada na fenda sináptica, de volta ao neurônio pré-sináptico por um transportador específico, o transportador de serotonina (SERT). Quando a 5-HT retorna ao citoplasma do neurônio pré-sináptico, pode ser transportado para vesículas através do VMAT ou sofrer degradação pelo sistema de monoamina oxidase (MAO), (SANDERS-BUSH & HAZELWOOG, 2012).



**Figura 2:** Síntese e degradação de serotonina (Golan, 9ª edição).

A 5-HT exerce suas ações em sistemas fisiológicos através da interação com seus receptores. Foram identificadas sete famílias de receptores (5-HT<sub>1</sub> – 5-HT<sub>7</sub>) com pelo menos 15 diferentes subtipos. Em sua maioria estão acoplados à proteínas G, com exceção do receptor 5-HT<sub>3</sub> que é um receptor ligado a canal iônico (HOYER, CLARKE et al., 1994). Os corpos celulares dos neurônios serotoninérgicos se iniciam no tronco cerebral, nos núcleos da rafe, e se projetam

para muitas áreas do cérebro, como o córtex, os gânglios basais, o cerebelo e áreas límbicas como hipocampo e amígdala, e medula espinhal (VISSER et al., 2011). Os receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> e 5-HT<sub>2C</sub> parecem intimamente relacionados a depressão e transtornos de ansiedade, o que é indicado tanto pelas suas localizações quanto pela ação de fármacos nesses receptores (GRAEFF et al., 1996; GRAEFF & ZANGROSSI, 2010).

## **6. Papel da Serotonina nos Transtornos de Ansiedade**

As primeiras evidências do envolvimento do sistema serotoninérgico na ansiedade foram obtidas em testes comportamentais relacionados a conflitos. Nestes modelos, um comportamento operante, como pressionar uma barra, é estimulado pela apresentação de uma recompensa, ao mesmo tempo em que pode ser suprimido por estímulos aversivos, como um choque nas patas. Desta forma, um comportamento é ao mesmo tempo recompensado e punido, gerando conflito (GELLER & SEIFTER, 1960).

Drogas que reduzem a ação da 5-HT liberam o comportamento punido, enquanto drogas que aumentam a ação da 5-HT acentuam a supressão de comportamentos induzidos por punição (GELLER, 1970; GRAEFF, 2002). Stein e colaboradores, em 1975, sugeriram que a 5-HT facilitaria a supressão comportamental devido a sua ação em estruturas prosencefálicas, como a amígdala, bem como no núcleo dorsal da rafe e na substância cinzenta periaquedutal (SCPA), regiões nas quais a 5-HT desempenharia um papel ansiogênico. Entretanto, estudos posteriores verificaram que, de fato a serotonina exercia um efeito ansiogênico no prosencéfalo, que não era observado na SCPA, uma vez que a estimulação de receptores da 5-HT na SCPA, por meio de agonistas, inibe a fuga induzida pela estimulação desta região. Considerando a fuga como um comportamento relacionado à ansiedade, a 5-HT exerce um papel ansiolítico na SCPA (GRAEFF et al., 2002).

Em resumo, a 5-HT parece ter um papel adaptativo em respostas defensivas associadas à ansiedade e ao pânico, nas quais possibilita a avaliação do perigo diante de uma ameaça. Na amígdala, região prosencefálica que tem a função de avaliar o grau de ameaça, e então instruir estruturas executivas, a 5-HT apresenta uma função ansiogênica, enquanto na matéria cinzenta

periaquedutal (SPCA), que é acionada em situações de perigo eminente, essa tem função ansiolítica (GRAEFF & DEAKIN, 1991).

O papel dos receptores serotoninérgicos no controle da ansiedade foi melhor embasado por estudos epigenéticos com controle de expressão gênica. Em estudos com animais “*knockout*” para receptores 5-HT<sub>1A</sub>, foram observadas respostas reforçadas de ansiedade, possivelmente resultando de um prejuízo no controle autoinibitório de neurônios serotoninérgicos. Enquanto em estudos com superexpressão do mesmo receptor, foi observado redução de ansiedade (KUSSEROW, et al., 2004). Ao passo que, em estudos com animais “*knockout*” para receptores 5-HT<sub>2A</sub> e 5-HT<sub>2C</sub> foi demonstrado uma diminuição em comportamentos relacionados a ansiedade (WEISSTAUB et al., 2006; BOURIN & DHONNCHADHA, 2005).

Assim sendo, a amígdala e o núcleo dorsal da rafe são estruturas relacionadas à modulação de emoções e de comportamentos. A amígdala está localizada na região anteromedial do lobo temporal do encéfalo e está diretamente relacionada com as repostas emocionais, em especial ao processamento de estímulos emocionais aversivos evocando comportamentos de medo e ansiedade. Além disso, tem relação com funções de atenção, percepção e memória, possivelmente através do seu papel geral no significado emocional para estímulos externos. Dentre os sistemas de neurotransmissores, a amígdala recebe densa inervação serotoninérgica, o que atua modulando comportamentos relacionados à ansiedade, medo condicionado, respostas de estresse e recompensas (para uma revisão, ver ASAN et al., 2013). Já o núcleo dorsal de rafe está distribuído próximo a linha média do tronco cerebral ao longo da extensão rostro-caudal, e é constituído principalmente por neurônios serotoninérgicos, possuindo relação com circuitos dos sistemas sensorial, motor ou límbico, sendo relacionado principalmente ao controle emocional (HORNUNG, 2003).

## **7. Tratamento dos transtornos de ansiedade**

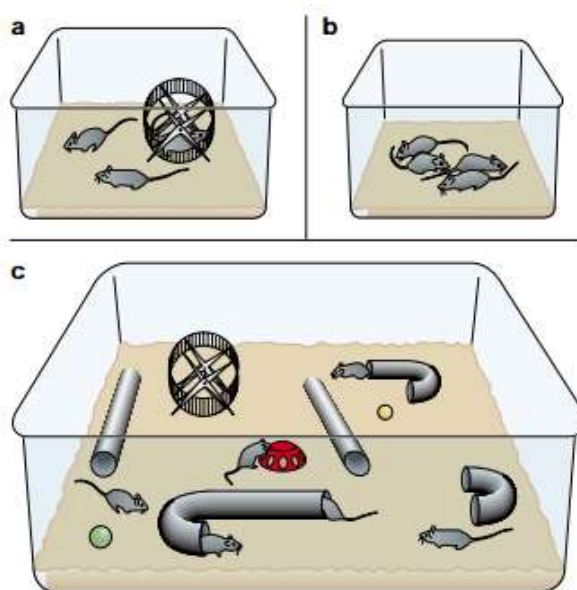
Os tratamentos dos transtornos de ansiedade envolvem a utilização de fármacos ansiolíticos e panicolíticos associados, por muitas vezes, ao tratamento psicológico (KACZKURKIN et al, 2015). Dentre as várias classes

farmacológicas utilizados no tratamento da ansiedade, encontram-se os benzodiazepínicos, que atuam facilitando a ação do GABA e, consequentemente, apresentando ação ansiolítica; os agonistas seletivos de receptores serotoninérgicos, no qual a buspirona é o principal fármaco dessa classe, atuando sobre receptores 5-HT<sub>1A</sub>; e os antidepressivos inibidores seletivos da recaptação de serotonina. No tratamento do transtorno de pânico, são utilizados, além de fármacos benzodiazepínicos, inibidores seletivos da recaptação de serotonina, e também os inibidores da MAO e os antidepressivos tricíclicos (para revisão uma, ver KOEN et al, 2011).

Embora diversos fármacos sejam utilizados para atenuar transtornos de ansiedade, na prática clínica um grande número de pacientes não responde adequadamente aos tratamentos, e muitos permanecem com sintomas residuais clinicamente significativos, o que representa um desafio para a terapêutica (MENEZES et al, 2007). Nesse sentido, o enriquecimento de ambientes, que é uma estratégia que tem destaque por seus efeitos neuroprotetores (LAVIOLA et al., 2008), poderia ser utilizado na tentativa de intervir em alterações provocadas por eventos adversos pós-natais e prevenir a ocorrência de transtornos psiquiátricos na idade adulta.

## **8. Enriquecimento ambiental**

O enriquecimento ambiental (EA) foi proposto, inicialmente, por Donald Hebb em 1947, ao observar que ratos que viviam livremente em sua casa possuíam memória melhor que os ratos que viviam em gaiolas em seu laboratório (HEBB, 1947). O EA consiste em um paradigma experimental no qual animais são alojados em um ambiente que permite seu desenvolvimento cognitivo e estímulos sensoriais muito maiores que os que ocorrem em condições de habitação padrão de laboratório (HEBB, 1947; VAN PRAAG et al., 2000). Nesse contexto, o ambiente habitacional é modificado (figura 3), com caixas de habitação maiores, objetos com cores, texturas e tamanhos diferenciados, que são trocados periodicamente e permitem maior interação e exploração (VAN PRAAG et al., 2000; NITHIANANTHARAJAH & HANNAN, 2006).



**Figura 3:** Condições de moradia de ambientes de habitação padrão comparado com ambientes enriquecidos (VAN PRAAG et al., 2000).

Em humanos, o enriquecimento ambiental é apresentado em crianças por meio de atividades que estimulam de forma física e psicológica, como brinquedos educativos, prática de atividades físicas e interação com outras crianças.

A exposição ao EA promove numerosos benefícios sensoriais, motores e cognitivos em animais de laboratório. Diversos autores observaram que o EA melhora significativamente a aprendizagem e a memória espacial e não-espacial, o reconhecimento de objetos, além de aumentar a velocidade da aprendizagem espacial (VAN PRAAG et al., 2000; NITHIANANTHARAJAH & HANNAN, 2006; KULESSKAYA et al., 2011; VEDOVELLI et al., 2011; LEGER et al., 2012). Além disso, o EA parece melhorar a aprendizagem de tarefas (HARATI et al., 2013), provavelmente devido a uma maior capacidade de consolidar e reter informações (GARDNER et al., 1975). Diversos estudos relatam ainda que o EA é capaz de reduzir a ansiedade, como evidenciado em uma variedade de testes (FERNANDEZ-TERUEL et al., 2002; LARSSON et al., 2002; HARATI et al., 2013).

As alterações comportamentais induzidas por EA podem estar ligadas a alterações específicas na funcionalidade neuronal. Por exemplo, estudos indicam que o EA promove alterações nos sistemas colinérgico (PARK et al., 1992), glutamatérgico (RAMPON et al., 2000), endocanabinóide (RAWAS et

al., 2011), no fator de crescimento do nervo (PHAM et al., 1999; RASIKA et al., 1999), no fator neurotrófico derivado do cérebro (FALKENBERG et al., 1992) e no fator neurotrófico derivado da glia (YOUNG et al., 1999). Os níveis de neurotransmissores afetados pela exposição ao EA sugerem sua relação com a plasticidade cerebral: por exemplo, estudos indicam que o EA induz um aumento na expressão do receptor de serotonina e nos níveis de serotonina, acetilcolina e noradrenalina (POR et al., 1982; RASMUSON et al., 1998; KOH et al., 2007; BARONCELLI et al., 2010).

Francis e colaboradores (2002), realizaram separação maternal por 3 horas diárias entre os DPN 2-14 e, após os desmame, submeteram os animais ao protocolo de EA contínuo até a idade adulta. Nesse estudo, o EA foi capaz de reverter completamente os efeitos provocados pela separação maternal tanto no eixo HHA quanto em respostas comportamentais relacionadas ao estresse. Os autores atribuem o efeito do EA a uma compensação, em vez de reversão, dos efeitos do estresse neonatal.

De acordo com o exposto, o presente estudo teve como objetivo testar a hipótese de que a privação maternal nos dias 11 e 13 após o nascimento poderia induzir efeitos ansiogênico, pânico-gênicos, aumento da atividade locomotora e alterações na memória aversiva de animais. Além disso, investigar se a privação maternal poderia provocar alterações no sistema serotoninérgico na amígdala e no núcleo dorsal da rafe, diminuindo a expressão do receptor 5-HT<sub>1A</sub>, e aumentando a expressão dos receptores 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2C</sub>. Além de provocar aumento do transportador de serotonina e diminuição da enzima triptofano hidroxilase. Assim sendo, tendo em vista os possíveis prejuízos provocados pela manipulação no período perinatal, juntamente com os benefícios provocados pelo enriquecimento ambiental, propomos investigar se o enriquecimento ambiental poderia minimizar os efeitos provocados pela privação maternal.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral**

Avaliar os efeitos do enriquecimento ambiental em animais submetidos a privação materna sobre comportamentos de ansiedade, bem como avaliar os efeitos dessas condições sobre a expressão gênica de componentes do sistema serotoninérgico.

### **Objetivos Específicos**

- Avaliar os efeitos da privação materna nos DPNs 11 e 13 sobre o comportamento no teste do labirinto em T elevado em animais na idade adulta;
- Avaliar os efeitos da privação materna nos DPNs 11 e 13 sobre o comportamento no teste do campo aberto em animais na idade adulta;
- Avaliar os efeitos da privação materna nos DPNs 11 e 13 sobre o comportamento no teste do odor de predador em animais na idade adulta;
- Avaliar os efeitos da privação materna nos DPNs 11 e 13 sobre o comportamento no teste de esquiva inibitória em animais na idade adulta;
- Avaliar os efeitos da privação materna nos DPNs 11 e 13 sobre a expressão de mRNA de componentes do sistema serotoninérgico: 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2C</sub>, SERT e TPH2 na amígdala e no núcleo dorsal da rafe;
- Verificar se a exposição ao enriquecimento ambiental a partir do desmame é capaz de alterar os comportamentos mencionados acima, bem como expressão gênica do sistema serotoninérgico.

*Artigo Científico*



**ARTIGO CIENTÍFICO**  
(Será submetido à Behavioral Neuroscience)

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS NEUROQUÍMICOS E COMPORTAMENTAIS DO  
ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL EM ANIMAIS SUBMETIDOS A PRIVAÇÃO  
MATERNAL**

Randriely Merscher Sobreira de Lima<sup>1</sup>; Martiello Januário da Mata<sup>1</sup>; Josefa Cristina Pereira Santos<sup>1</sup>; Ludhielle Costa Oliveira<sup>1</sup>; Athelson Stefanon Bittencourt<sup>1,3</sup>; Valério Garrone Baraúna<sup>2</sup>; Ana Paula Santana de Vasconcellos Bittencourt<sup>1,2</sup>

1- Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia – Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Marechal Campos, 1468 – Maruípe, Vitória-ES, Brasil, CEP: 29047-100.

2- Departamento de Ciências Fisiológicas – Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Marechal Campos, 1468 – Maruípe, Vitória-ES, Brasil, CEP: 29047-100.

3- Departamento de Morfologia - Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Marechal Campos, 1468 – Maruípe, Vitória-ES, Brasil, CEP: 29047-100.

## RESUMO

A relação entre mãe e filhote apresenta um papel de extrema importância para mamíferos, dado a importância do cuidado e da aproximação materna nos primeiros dias de vida. Eventos traumáticos nesse período podem prejudicar o desenvolvimento fisiológico e psicológico dos filhotes, podendo causar alterações em curto e longo prazo. A privação materna (PM) é um protocolo bem estabelecido e utilizado para investigar alterações tanto neurobiológicas quanto comportamentais, como os transtornos de ansiedade. Ao mesmo tempo, vem sendo demonstrado que protocolos de enriquecimento ambiental (EA) promovem numerosos benefícios sensoriais, motores e cognitivos em animais de laboratório, podendo ser utilizado na tentativa de intervir em alterações provocadas por eventos adversos pós-natais e prevenir a ocorrência de transtornos psiquiátricos na idade adulta. Nesse contexto, buscamos avaliar as implicações do enriquecimento ambiental como estratégia para prevenção dos efeitos provocados pela privação materna sobre comportamentos de ansiedade e sobre a expressão gênica de componentes do sistema serotoninérgico. Para tanto, ratos Wistar machos foram privados da presença materna durante dois períodos de 24 horas, nos dias pós-natal (DPN) 11 e 13. Os animais não privados foram mantidos sob mínimas condições de manipulação. Após o desmame, no DPN 21, esses animais foram submetidos ao enriquecimento ambiental ou a condições padrão de alojamento, assim permanecendo até o início da idade adulta. No DPN 60 foram iniciados os testes comportamentais de ansiedade, sendo eles: labirinto em T elevado (LTE), campo aberto (CA), teste de odor de predador (TOP); e teste de memória aversiva, o teste de esQUIVA INIBITÓRIA. Ao final dos testes comportamentais, os animais foram eutanasiados para obtenção das estruturas amígdala e núcleo dorsal da rafe. A expressão de mRNA dos componentes do sistema serotoninérgico: 5-HT1A, 5-HT2A, 5-HT2C, SERT e TPH2, foram avaliados em ambas as estruturas. Observamos no LTE que a PM aumentou o tempo de esQUIVA 1, enquanto o enriquecimento aumentou o tempo de esQUIVA 2, sem alterações relacionadas a fuga. A PM não provocou mudanças no CA, mas o EA diminuiu a atividade locomotora em todos os parâmetros avaliados. A PM também não provocou alterações no TOP, entretanto o EA causou diminuição do tempo no compartimento escondido e aumento do tempo

de investigação da fonte do odor. Nenhuma das condições provocou alteração no teste de esquiva inibitória. Além disso, nem a PM, nem o EA provocaram alterações na expressão de mRNA de componentes do sistema serotoninérgico na amígdala e no núcleo dorsal da rafe. Podemos concluir que ambas as condições provocam efeitos ansiogênicos sem alterar a memória aversiva, mas apenas o EA altera a resposta a novos ambientes e contextos, e apesar do notório envolvimento da rafe dorsal e da amígdala com a ansiedade, a neurotransmissão serotoninérgica nestas estruturas não é alterada pela privação maternal e pelo enriquecimento ambiental.

Palavras-chave: Privação maternal. Ansiedade. Enriquecimento ambiental. Sistema serotoninérgico.

## 1. INTRODUÇÃO

As experiências dos primeiros anos de vida são determinantes para o desenvolvimento dos indivíduos, sendo que as relações parentais de cuidado e proteção permitem esse desenvolvimento (SULLIVAN, 2003). Durante o período perinatal diversos sistemas continuam seu processo de maturação, em especial o sistema nervoso central (DUBOIS et al., 2014), sendo assim, qualquer perturbação nesse período poderá ocasionar prejuízos na formação de circuitos neurais e, conseqüentemente, alterações no desenvolvimento de filhotes (SCHMIDT et al., 2002; FAN et al., 2011). Nesse sentido, a privação da presença maternal se constitui de um protocolo bem estabelecido e utilizado para investigar alterações neurobiológicas e comportamentais provocados pelo estresse neonatal (HEIM & NEMEROFF, 2001; SÁNCHEZ et al., 2001; LAMBAS-SEÑAS et al., 2009; MARCO et al., 2015).

Diversos estudos evidenciam que a privação maternal (PM) pode induzir alterações comportamentais de curto e longo prazo. Esses efeitos ainda são controversos, e por isso são bastante abordados na literatura. Por exemplo, diferentes resultados são relatados com relação à ansiedade no teste de labirinto em cruz elevado: estudos com animais adolescentes submetidos a PM no DPN (dia pós-natal) 9 não encontraram alterações relevantes, (LLORENTE et al., 2011; MARCO et al., 2013); enquanto estudos em animais adultos observaram comportamentos tipo ansiolítico (LLORENTE-BERZAL et al., 2011; BURKE et al., 2013), enquanto estudos com a PM realizada no DPN 11 observaram efeito tipo ansiogênico (FATURI et al., 2010; NETO, et al., 2012).

Além disso, dados da literatura também evidenciam alterações com relação à privação maternal e o sistema serotoninérgico. Estudos que avaliaram a PM no DPN 9 observaram aumento da atividade serotoninérgica no hipotálamo (RENTESI et al 2010), e diminuição dos seus metabólicos no córtex pré-frontal, amígdala e estriado (RENTESI et al, 2013). Em contraste, Llorente et al. (2010) observaram aumento dos níveis de 5-HT no córtex pré-frontal, hipocampo, estriado, mesencéfalo e cerebelo de animais adolescentes. Esses achados corroboram os resultados encontrados em comportamentos relacionados à ansiedade.

As primeiras evidências do envolvimento do sistema serotoninérgico na ansiedade foram obtidas em testes comportamentais relacionados a conflitos (GELLER & SEIFTER, 1960). De uma forma geral, a 5-HT apresenta um papel adaptativo em respostas defensivas associadas à ansiedade e ao transtorno de pânico, nas quais possibilita a avaliação do perigo diante de uma ameaça. Na amígdala, região prosencefálica que tem a função de avaliar o grau de ameaça, e então instruir estruturas executivas, a 5-HT apresenta uma função ansiogênia, enquanto na matéria cinzenta periaquedutal, que é acionada em situações de perigo iminente, essa tem função ansiolítica (GRAEFF & DEAKIN, 1991).

Embora diversas medicações que atuam no sistema serotoninérgico sejam prescritas para dos transtornos de ansiedade, na prática, um grande número de pacientes não responde adequadamente ao tratamento e muitos permanecem com sintomas residuais clinicamente significativos (MENEZES et al, 2007). Nesse sentido, o enriquecimento de ambientes é uma estratégia que possui destaque por seus efeitos neuroprotetores (LAVIOLA et al., 2008).

O enriquecimento ambiental (EA) consiste em um paradigma experimental no qual animais são alojados em um ambiente que permite seu desenvolvimento cognitivo e estímulos sensoriais muito maiores que os que ocorrem em condições de habitação padrão de laboratório (HEBB, 1947; VAN PRAAG et al., 2000). Diversos autores observaram que o EA melhora significativamente a aprendizagem e a memória espacial e não-espacial, o reconhecimento de objetos, além de aumentar a velocidade da aprendizagem espacial (VAN PRAAG et al., 2000; NITHIANANTHARAJAH & HANNAN, 2006; KULESSKAYA et al., 2011; VEDOVELLI et al., 2011; LEGER et al., 2012). Desta forma o enriquecimento ambiental poderia ser utilizado na tentativa de intervir em alterações provocadas por eventos adversos pós-natais.

De acordo com o acima exposto, uma ampla gama de resultados estão relacionados aos efeitos de longo prazo da PM no DPN 9. Sabendo que as duas primeiras semanas de vida são extremamente delicadas para filhotes, a PM realizada em outros dias desse período pode potencialmente provocar alterações duradouras, sendo estes, portanto, possíveis alvos de investigação. Desta forma, tendo em vista a propensão a alterações comportamentais provocadas pelo estresse neonatal, o presente trabalho buscou investigar os efeitos do enriquecimento ambiental em animais submetidos a privação maternal

nos DPNs 11 e 13, sobre comportamentos de ansiedade e sobre a expressão gênica de componentes do sistema serotoninérgico, visando estabelecer uma possível estratégia para prevenção de transtornos de ansiedade provocados pelo estresse neonatal.

## **2. MÉTODOS**

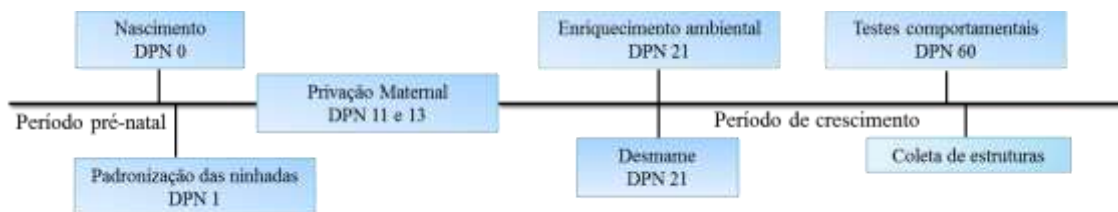
### **2.1. Animais Experimentais**

Foram utilizados ratos Wistar, sendo fêmeas nulíparas e machos, ambos pesando entre 220-250g, fornecidos, pelo Biotério Central do Centro de Ciências da Saúde. Estes animais foram alocados em caixas viveiro (49 cm x 34 cm x 16cm) para cruzamento na proporção de 3 ratas para cada macho. Após 20 dias de cruzamento, as fêmeas gestantes foram retiradas do cruzamento e isoladas em caixas menores (30 cm x 20 cm x 13 cm), nas quais permaneceram até o nascimento das ninhadas. As fêmeas gestantes foram observadas diariamente para determinação da data de nascimento dos filhotes. No primeiro dia pós-natal (DPN 1) foi realizada a adequação das ninhadas, permanecendo o número máximo de oito filhotes machos por rata. Todos os animais foram mantidos num ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes acesas das 6:00 às 18:00), com temperatura ambiente de  $22 \pm 2$  °C e com água e comida (ração padrão) ad libitum. Este trabalho possui aprovação no comitê de ética da Universidade Federal do Espírito Santo sob número 080/2015.

### **2.2. Desenho experimental**

Após o nascimento, as ninhadas foram padronização e os animais foram divididos em grupos controle e privação maternal e posteriormente subdivididos em grupos submetidos ou não ao enriquecimento ambiental. Os animais controle permaneceram com as mães até o desmame (DPN 21), sofrendo o mínimo de manipulação possível.

O enriquecimento ambiental foi iniciado após o desmame dos filhotes, tanto em ambos os grupos experimentais, no 21 DPN e mantido como caixa de moradia até o sacrifício dos animais. Os testes comportamentais foram iniciados após o DPN 60, os quais seguiram a seguinte ordem: labirinto em T elevado, campo aberto, teste do odor de predador e teste de esquiva inibitória. Ao final dos testes comportamentais foi realizada a eutanásia dos animais para a obtenção das estruturas encefálicas e posterior análise da expressão gênica, conforme exemplificado na figura 1:



**Figura 1:** Desenho experimental. Fonte: Imagem própria.

### 2.3. Privação Maternal

Os procedimentos de privação maternal foram realizados nos dias 11 e 13 após o nascimento, nos quais os filhotes sofreram separação de suas mães por dois períodos de 24 horas. Para os procedimentos de privação maternal, no DPN 11 a mãe foi removida da ninhada para outra caixa e transferidas para outra sala, em seguida todos os filhotes foram retirados do ninho e acomodados em uma única caixa, no qual permaneceram por 24 horas, em uma sala terceira (figura 2). Passando esse período, os filhotes juntamente com as mães retornaram para caixas de moradia padrão, permanecendo 24 horas. No DPN 13, novamente as mães foram removidas da ninhada para outra caixa e em seguida todos os animais foram acomodados em uma única caixa no qual permaneceram por 24 horas, retornando juntamente com as mães para a caixa de moradia padrão após esse período e permanecendo em contato materno até o desmame. Os procedimentos ocorreram sempre no mesmo horário, tendo início entre 9:00 e 11:00h (modificado de ELLENBROEK, et al., 2004).



**Figura 2:** Caixa de privação maternal. Fonte: Arquivo pessoal



## 2.4. Enriquecimento Ambiental

O EA foi iniciado imediatamente após a desmame dos animais, aos 21 dias de idade, e mantido até a eutanásia dos animais, após os testes comportamentais. O protocolo de EA consistiu na exposição a um ambiente enriquecido, composto por uma caixa moradia de maior dimensão que a usual (64 cm x 44 cm x 18 cm), contendo roda de atividade e objetos de diferentes formas, texturas, cores e tamanhos, sendo que os objetos foram trocados semanalmente (figura 3). Os animais não submetidos ao ambiente enriquecido foram acondicionados em caixas de polipropileno de tamanho padrão (49cm x 34 cm x 16 cm), (Adaptado de WIDMAN & ROSELLINI,1990 e KONKLE et al.,2010).



**Figura 3:** Caixa de enriquecimento ambiental. Fonte: arquivo pessoal.

## 2.5. Testes Comportamentais

### 2.5.1. Labirinto em T elevado

O teste do Labirinto em T Elevado (LTE) constitui-se de uma adaptação do teste de Labirinto em Cruz elevado. Na qual, um aparato elevado 70 centímetros do chão, contém um braço fechado (50 x 10 x 40 centímetros) perpendicular a dois braços abertos em oposição um ao outro (50 x 10 centímetros). Este teste permite avaliar dois comportamentos distintos: a resposta de esquia inibitória (tomada como medida de ansiedade) e a resposta de fuga, a qual é postulada como uma resposta do tipo pânico (GRAEFF et al., 1998).

O teste foi realizado em duas sessões. Inicialmente, os animais foram habituados aos braços abertos do labirinto por 30 minutos, procedimento que facilita as respostas de escape que foram avaliadas durante o teste. No dia seguinte foram avaliados os comportamentos de esquiva inibitória e fuga. Para o comportamento de esquiva inibitória os animais foram colocados na porção distal do braço fechado, e o tempo necessário para que eles deixem o braço fechado foi tomado como medida de esquiva. Para a avaliação da fuga, os animais foram colocados na extremidade distal de um dos braços abertos, e o tempo necessário para que eles deixem o braço aberto (resposta de fuga) e entrem no braço fechado foi contabilizado. Em todos os dois comportamentos os animais foram submetidos a três tentativas, com intervalo de 30 segundos entre elas.



**Figura 4:** Labirinto em T elevado (LTE), GRAEFF *et al.*, 1998.

### **2.5.2. Teste do Campo Aberto**

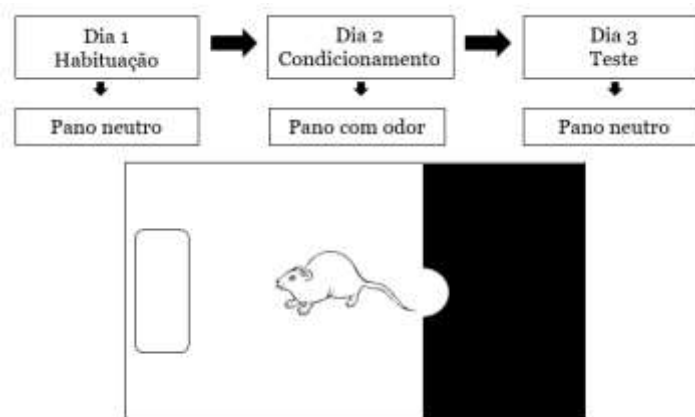
Este teste seguiu o modelo proposto inicialmente por Archer, 1973, e consiste em um protocolo simples cujos componentes têm sido amplamente utilizadas para mensuração de comportamentos relacionados com atividade locomotora e ansiedade (MATTO & ALLIKMETS, 1999; COURVOISIER *et al.*, 1996). Para tanto, os animais foram submetidos, individualmente, a uma caixa preta na dimensão de 1m<sup>2</sup> e 30 cm de altura (campo aberto), e o seu comportamento foi registrado em vídeo por 5 minutos (Logitech HD C270, Suíça). Para análise dos comportamentos, foram avaliadas a atividade locomotora, a centrotaxia, (distância percorrida na área central do campo aberto)

e peritaxia (distância percorrida na região periférica do campo aberto), com auxílio do software ANY-maze (Stoelting Co., EUA).

### **2.5.3. *Teste do Odor do Predador***

O teste de odor de predador (TOP) tem como objetivo analisar o comportamento defensivo e aversivo dos animais. Partindo do princípio de que odores derivados dos predadores são estímulos efetivos para evocar comportamentos de defesa, visto que mamíferos desenvolvem comportamentos específicos quando reconhecem odores de predadores a fim de sobrevivência. Além disso, esses comportamentos estão associados ao medo contextual, aprendizado aversivo e memória (APFELBACH et al., 2005).

Para isso foi utilizado um aparato retangular (83cm x 52cm x 45cm) com 50 cm de altura, dividido em dois compartimentos: um compartimento aberto (54cmx45cm) onde ficou localizado um pano (40cmx25cm), o qual, dependendo da sessão do teste, continha ou não odor do predador, e um compartimento fechado (29cmx28cm). Conectando os dois compartimentos havia uma abertura que permitia passagem do animal (figura 5). O teste foi realizado em três sessões, com 5 minutos cada e intervalos de 24 horas entre elas. No 1º dia (habituação), o aparato continha um pano neutro (sem odor) localizado no compartimento aberto. No 2º dia (condicionamento), o pano continha o odor de predador, e no 3º dia (teste), o pano era novamente neutro. O odor do predador era conferido pelo acréscimo, ao pano utilizado, de uma areia higiênica para gatos contendo resquício de urina deste animal. Em todas as sessões os animais foram colocados no aparato com livre acesso aos dois compartimentos, dispondo de 5 minutos para exploração. O objetivo foi avaliar o medo condicionado e ansiedade contextual, e para tanto os parâmetros analisados foram: tempo de permanência no compartimento fechado e tempo de investigação do pano, avaliados em segundos.



**Figura 5:** esquema do aparato para o teste de odor de predador

#### **2.5.4. Teste de esquia inibitória**

O teste de esquia inibitória é baseado no condicionamento Pavloviano, e consiste na utilização de um aparato que possibilita ao animal a associação de um contexto, inicialmente não aversivo, ao recebimento de um choque elétrico. Essa associação provoca uma resposta condicionada, a qual representa a aprendizagem de uma tarefa aversiva (GOLD, et al., 1986).

O aparato para realização do teste consiste em uma caixa de acrílico, que possui uma grade metálica no chão e uma plataforma de madeira acima da grade. Para a realização da tarefa de esquia inibitória, os animais foram submetidos ao teste por dois dias consecutivos. No primeiro dia, o treino, o animal foi colocado na plataforma de madeira e foi contabilizado o tempo necessário, em segundos, para que o animal descesse da plataforma. Ao realizar esse procedimento os animais recebiam um choque nas patas, com intensidade de 0,5 A (FILHO, et al., 2015). No segundo dia (teste), o animal foi novamente exposto ao aparato, e o tempo gasto para descer da plataforma foi novamente contabilizado.

### **2.6. Eutanásia e obtenção das amostras**

Os animais foram mortos por decapitação após a realização dos testes comportamentais, sem uso de anestesia, visto que o uso de anestésicos pode interferir na função do sistema nervoso central. Para tanto, os animais foram individualmente levados para uma sala, separado dos demais, e mortos por um experimentador experiente com o uso de guilhotina. O encéfalo foi rapidamente

retirado da caixa craniana e as estruturas analisadas, amígdala e núcleo dorsal da rafe, foram dissecadas segundo coordenadas descritas por Paxinos e Watson (1986). As amostras foram armazenadas em freezer a -80°C até o momento das análises.

## **2.7. Análise da expressão gênica**

### **2.7.1. Extração de RNA total**

O RNA total foi extraído utilizando TRIzol® Reagent (Life Technologies, USA) seguindo as recomendações do fabricante. Os tecidos foram solubilizados em trizol (1mL/100mg de tecido) com o uso de um homogeneizador e em seguida, foi centrifugado a 12.000 xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e a ele foi adicionado clorofórmio (200µL/mL de trizol), o tubo foi agitado por 15 segundos e incubado a temperatura ambiente por 3 minutos. O tubo foi novamente centrifugado a 12.000xg por 15 minutos a 4°C. Em seguida transferiu-se a fase aquosa para um novo tubo, e a esta foi adicionado isopropanol (500µL/mL de trizol), para a precipitação do RNA. O tubo foi centrifugado a 12.000xg por 10 minutos a 4°C e o precipitado foi lavado com etanol 75% (1mL/1 mL de trizol) e centrifugado a 7500xg por 5 minutos a 4°C. O RNA foi ressuspensionado em 10 µL de água deionizada, previamente tratada com dietilpírocarbonato (DEPC). A concentração e a qualidade do RNA extraído foram verificadas utilizando o equipamento NanoDrop™ (ThermoScientific, Wilmington, USA) e por meio de eletroforese em gel de agarose, respectivamente.

### **2.7.2. Eletroforese em gel de agarose**

A qualidade do RNA foi analisada através de uma corrida com gel de agarose, no qual o gel foi preparado a 1% em TAE (Tris-ácido acético EDTA), e a este foi adicionado 5 µL de SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen, USA). As amostras foram preparadas utilizando 1 µL de RNA, 2 µL de Loading Buffer e 9 µL de água DEPC, e foram aplicadas no gel. A corrida foi realizada a 80 V por 30 minutos, utilizando o TAE como tampão de corrida. As bandas foram observadas em um transiluminador UV.

### 2.7.3. Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada utilizando o iScript Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR (Biorad, CA, USA) usando o equipamento S1000 Thermal Cycler (Biorad, CA, USA). As amostras foram submetidas ao seguinte protocolo de reação: 25°C por 5 minutos (anelamento), 42°C por 30 minutos (transcrição reversa) e 85°C por 5 minutos (inativação da transcriptase reversa).

### 2.7.4. Reação de PCR em tempo real

A reação de PCR em tempo real foi realizada utilizando o equipamento CFX96 Real Time PCR (Biorad, CA, USA) e o iQ SYBR Green Supermix (Biorad, CA, USA). As reações foram preparadas com um volume total de 10 µL, contendo 5 µL de SYBR Green Supermix 2x, 2,24 µL de água DEPC, 0,88 µL de cada iniciador a 10 µM e 1,0 µL de cDNA. As amostras foram preparadas em triplicata e submetidas à desnaturação inicial (95°C por 3 minutos), logo após foram realizados 40 ciclos de 15 segundos a 95°C (desnaturação) e 60 segundos a 60°C (anelamento e amplificação). Ao final, foi realizada a curva de melting dos produtos amplificados para confirmar a especificidade da reação, esta foi obtida variando a temperatura das amostras de 55 a 95°C, elevando-se a temperatura em 0,5°C a cada 5 segundos. A quantificação relativa da expressão gênica foi feita pelo método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  utilizando o gene da GAPDH como normalizador e expressos % do grupo controle. Os genes, assim como os primers utilizados, estão descritos na tabela 1.

**TABELA 1** Sequências de iniciadores utilizadas por gene

mRNA	Gene	Sequência
GAPDH	GAPDH	F-5'-TGCCCCCATGTTTGTGATG-3' R-5'-TGGTGGTGCAGGATGCATT-3'
Receptor HT <sub>1A</sub>	HTR1A	F-5'-CCGTGAAAGGAAGACGGTGA-3' R- 5'-AATGAAAAACGGCAGCCAGC-3'
Receptor HT <sub>2A</sub>	HTR2A	F-5'-CCAACGGTCCATCCACAGAG-3' R- 5'-TGCACGCCTTTTGCTCATTG-3'
Receptor HT <sub>2C</sub>	HTR2C	F-5'-GTCACACCGAGGAGGAACTG-3' R- 5'-GGTGATGAAAAACGGGCACC-3'
Transportador de serotonina	SERT	F-5'-GCCAAGCCTGATGAAGACAC-3' R- 5'-ACGGAAAGAAGTGGTCGGAA-3'
Triptofano Hidroxilase	TPH2	F-5'-TAGAGGATGTGCCGTGGTTC-3' R- 5'-CAGCCAGGAAGTCTCTTGGG-3'

## 2.8. Análise Estatística

A comparação dos efeitos das diferentes condições – privação maternal e enriquecimento ambiental – foi realizada utilizando uma ANOVA de duas vias, tendo como fatores a privação e o enriquecimento. As comparações entre os diferentes grupos foram conduzidas através da ANOVA de uma via seguida por teste post-hoc de Duncan. Por fim, foi utilizada uma ANOVA de duas vias com medidas repetidas para o teste do labirinto em T elevado, o teste do odor de predador e o teste de esquiva inibitória. Foi considerado o nível de significância  $p < 0,05$ . Para a realização da ANOVA foi utilizado o software IBM SPSS Statistics 22 e os resultados foram expressos com média dos dados mais o erro padrão da média.

## 3. RESULTADOS

### 3.1. Labirinto em T elevado

#### 3.1.1. Esquiva Inibitória

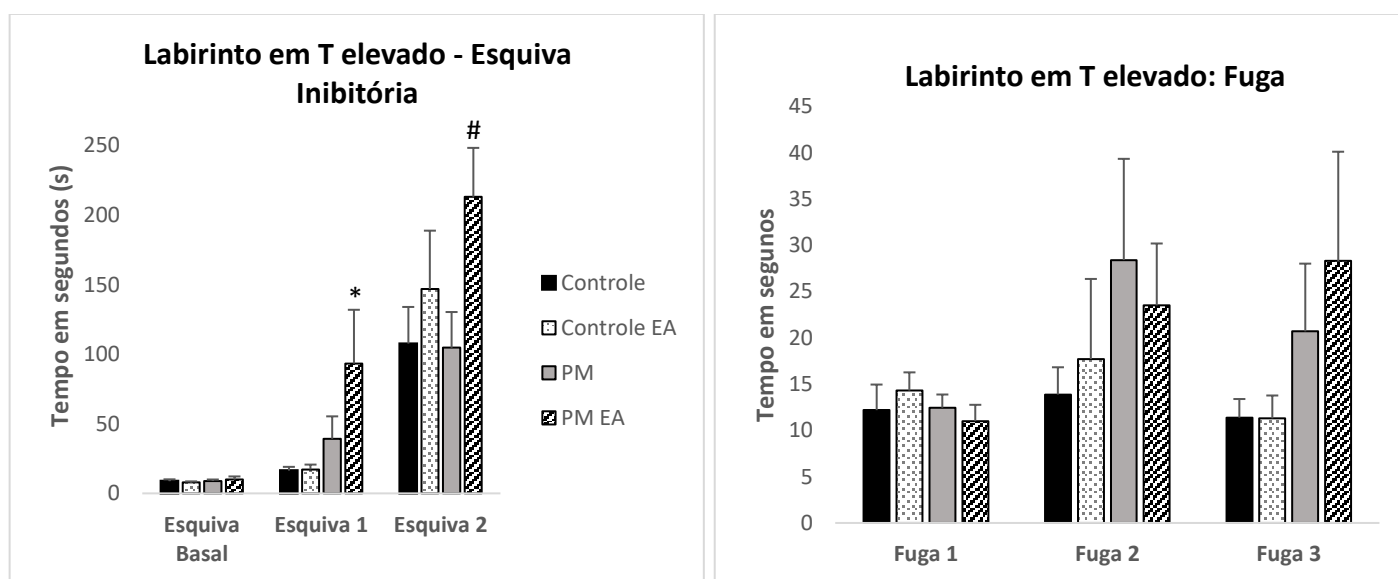
A ANOVA de medidas repetidas indicou efeito das sessões de esquiva durante a realização do teste [ANOVA de medidas repetidas,  $F(2,53) = 35,80$ ;  $P < 0,000$ ] indicando que ocorreu aprendizado. Não houve interação entre o enriquecimento ambiental e as sessões de esquiva [ANOVA de medidas repetidas, EA:  $F(2,53) = 2,51$ ;  $P = 0,091$ ], entretanto, observamos interação entre estas e a privação maternal [ANOVA de medidas repetidas, EA:  $F(2,53) = 3,25$ ;  $P = 0,047$ ]. Não houve interação entre os três fatores [ANOVA de medidas repetidas, Sessão\*PM\*EA:  $F(2,53) = 1,00$ ]. Com relação a comparação dos efeitos entre as variáveis, observamos ao longo das sessões, efeito enriquecimento ambiental e uma tendência de efeito da privação maternal, sem interação entre os fatores ([EA  $F(2,53) = 5,02$ ;  $P = 0,02$ ], [PM  $F(2,53) = 3,2$ ;  $P = 0,07$ ]; [PM\*EA  $F(2,53) = 2,58$ ]).

A análise *post hoc* de Duncan indicou que o grupo PM-EA foi diferente de todos os grupos na esquiva 1 (Teste de Duncan,  $P = 0,03$ ), além de uma tendência

a diferença entre os grupos na esquivia 2, no qual o grupo PM EA foi diferentes dos grupos Controle e PM (Teste de Duncan,  $P=0,08$ ).

### 3.1.2. Fuga

Na fuga 1 não observamos efeito da privação maternal [ANOVA de duas vias,  $F(1,55) = 0,89$ ], do enriquecimento ambiental [ANOVA de duas vias,  $F(1,55) = 0,53$ ], ou interação entre os dois [ANOVA de duas vias,  $F(3,55) = 0,38$ ]. O mesmo ocorreu na fuga 2 {PM [ANOVA de duas vias,  $F(1,55) = 0,08$ ], EA [ANOVA de duas vias,  $F(1,55) = 0,33$ ], ou interação entre os dois [ANOVA de duas vias,  $F(3,55) = 0,03$ ]} e na fuga 3 {PM [ANOVA de duas vias,  $F(1,55) = 0,24$ ], EA [ANOVA de duas vias,  $F(1,55) = 0,09$ ], ou interação entre os dois [ANOVA de duas vias,  $F(3,55) = 0,92$ ]. Quanto o teste de Duncan, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos nas três tentativas de fuga ( $P>0,05$ ).



**Figura 6:** Efeito da privação maternal e do enriquecimento ambiental sobre o comportamento no labirinto em T elevado. Latência, em segundos, para sair do compartimento fechado do LTE (esquivia inibitória) e latência para fuga do braço aberto do LTE. Dados expressos como média. Dados expressos como média + EPM,  $N = 20-10$  por grupo.

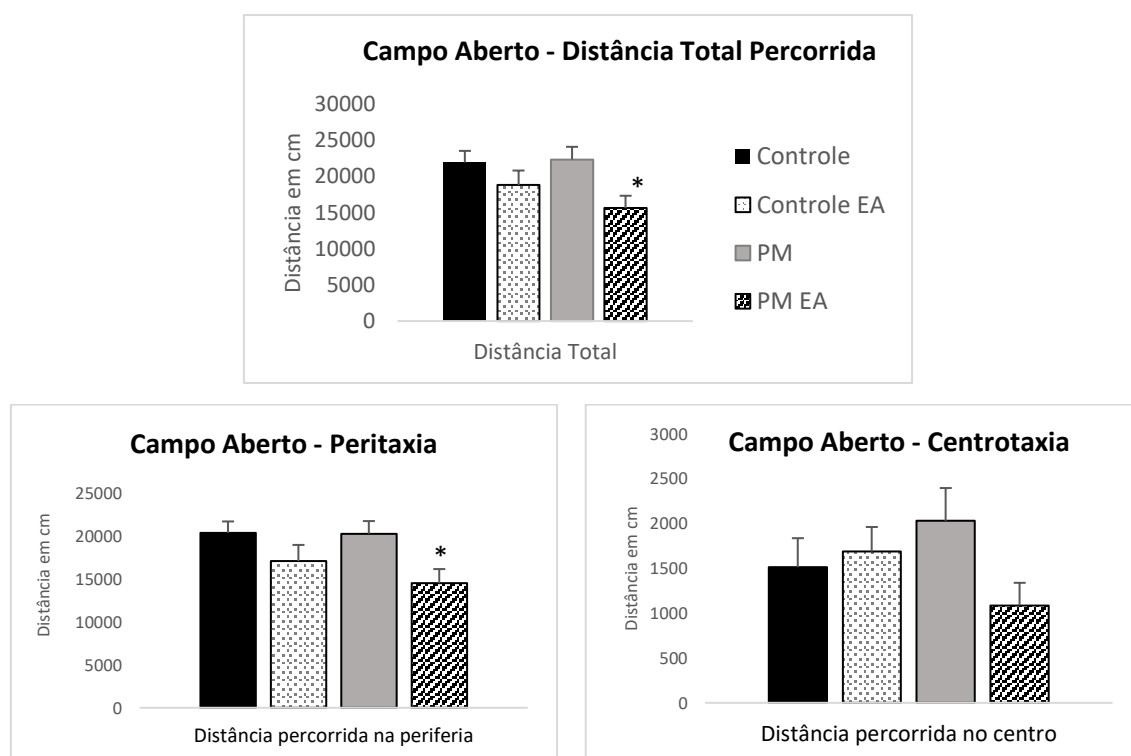
\*: Diferente de todos os grupos (teste de Duncan,  $P < 0,05$ ).

#: Diferente dos grupos Controle e PM (teste de Duncan,  $P < 0,05$ ).

### 3.2. Teste do Campo Aberto



No teste de campo aberto, a ANOVA de duas vias para a distância total percorrida indicou efeito do EA [ANOVA de duas vias,  $F(1,61) = 4,62$ ;  $P = 0,03$ ]. Entretanto, não houve efeito da PM [ANOVA de duas vias,  $F(1,61) = 0,27$ ], ou interação entre os fatores [ANOVA de duas vias,  $F(1,61) = 0,10$ ]. Da mesma forma, houve efeito do EA na distância percorrida na periferia do aparato, [ANOVA de duas vias,  $F(1,61) = 5,04$ ;  $P = 0,02$ ], sem efeito da PM [ANOVA de duas vias,  $F(1,61) = 0,34$ ], ou interação entre os fatores [ANOVA de duas vias,  $F(1,61) = 0,91$ ]. Quanto a distância percorrida no centro do aparato, não houve efeito significativo de nenhuma das condições [ANOVA de duas vias, EA:  $F(1,61) = 0,96$ ; PM:  $F(1,61) = 0,001$ ; interação entre os fatores:  $F(1,61) = 1,72$ ]. Com relação a distância total percorrida, e a distância percorrida na periferia do aparato, o *post-hoc* de Duncan indicou que o grupo PM EA é diferente dos grupos controle e PM ( $P < 0,05$ ). Na análise da distância percorrida no centro do aparato não houve diferença entre os grupos ( $P > 0,05$ ).



**Figura 7:** Efeito da privação materna e do enriquecimento ambiental no teste do campo aberto, nos comportamentos de distância total percorrida, distância percorrida periferia do aparato e distância percorrida periferia do aparato. Dados expressos como média + EPM,  $N = 20-11$  por grupo.

\*: Diferente do grupo controle e PM (teste de Duncan,  $P < 0,05$ ).

### 3.1. Teste do Odor de Predador

#### 3.1.1. Tempo no Compartimento Escondido

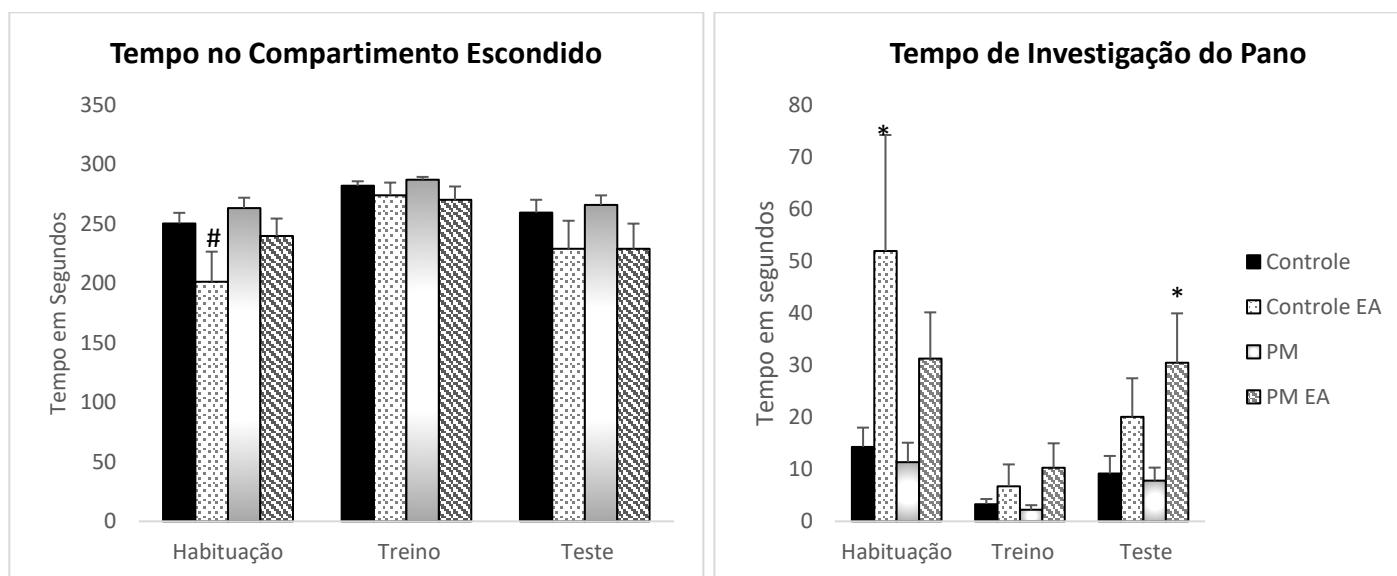
No Teste de Odor de Predador, avaliamos inicialmente o tempo no compartimento escondido nos três dias de teste. A ANOVA de medidas repetidas indicou que houve um efeito das sessões no tempo de permanência no compartimento escondido, [ANOVA de medidas repetidas,  $F(2,64) = 17,87$ ;  $P < 0,000$ ] indicando que os animais foram condicionados durante o teste. Não houve interação entre as sessões e a privação maternal, o enriquecimento ambiental, ou interação entre os fatores (ANOVA de medidas repetidas [PM  $F(2,64) = 1,88$ ]; [EA  $F(2,64) = 1,71$ ]; [PM\*EA  $F(2,64) = 0,92$ ]). Com relação a comparação dos efeitos entre as variáveis, observamos efeito enriquecimento ambiental ao longo das sessões (EA  $F(2,64) = 9,25$ ;  $P = 0,003$ ), sem efeito da privação maternal ou interações ([PM  $F(2,64) = 1,2$ ]; [PM\*EA  $F(2,64) = 0,35$ ]). Porém, através do teste de Duncan, observamos diferenças entre os grupos no primeiro dia de teste, no qual o grupo controle EA foi diferente dos demais grupos ( $P = 0,01$ ).

#### 3.1.2. Tempo de investigação do pano

Durante as sessões do teste, observamos efeito das sessões quanto ao tempo de investigação do pano [ANOVA de medidas repetidas,  $F(2,64) = 15,43$ ;  $P < 0,000$ ]. Não foi observada interação entre as sessões e a privação maternal [PM: ANOVA de medidas repetidas,  $F(2,64) = 2,47$ ], porém observamos interação com o enriquecimento ambiental [EA: ANOVA de medidas repetidas,  $F(2,64) = 4,38$ ;  $P = 0,025$ ], sem interação entre as sessões e as condições de tratamento [Sessão\*PM\*EA: ANOVA de medidas repetidas,  $F(2,64) = 1,96$ ]. Observamos, na comparação dos efeitos entre as variáveis, um efeito enriquecimento ambiental ao longo das sessões (EA  $F(2,64) = 14,42$ ;  $P = 0,000$ ), sem efeito da privação maternal ou interações ([PM  $F(2,64) = 0,2$ ]; [PM\*EA  $F(2,64) = 0,002$ ]).

O *post hoc* de Duncan indicou diferença entre os grupos no primeiro dia de teste, no qual o grupo controle EA permaneceu mais tempo investigando o pano que os grupos controle e PM ( $P = 0,01$ ). No segundo dia de teste, no entanto,

não observamos diferenças entre os grupos quanto a investigação do pano ( $P>0,05$ ). No terceiro dia de teste também observamos diferença entre os grupos, no qual o grupo PM EA foi diferente dos grupos controle e PM, permanecendo por um maior período investigando o pano ( $P=0,01$ ).



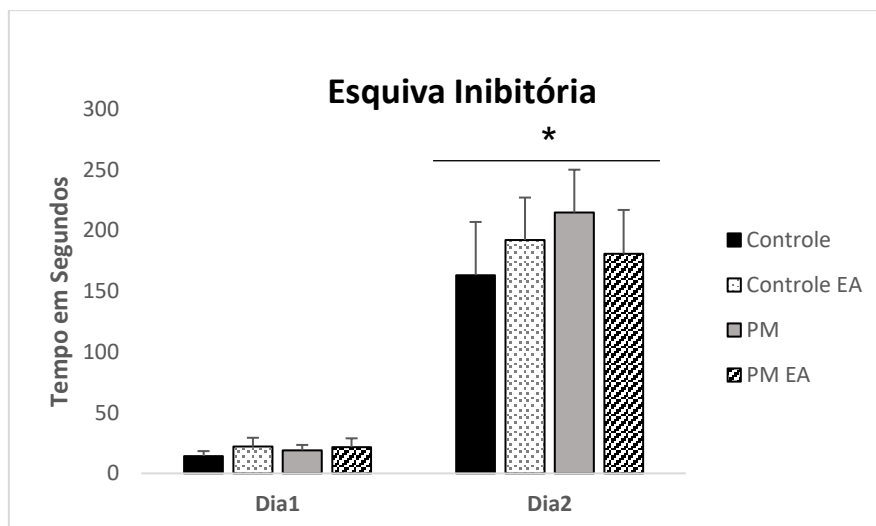
**Figura 8:** Efeito da privação maternal e do enriquecimento ambiental no teste do odor de predador. Tempo (em segundos) de permanência no compartimento escondido e tempo (de investigação do pano no teste de odor de predador. Dados expressos como média + EPM, N = 22-11 por grupo;

#: Diferente dos demais grupos (teste de Duncan,  $P < 0,05$ );

\*: Diferente dos grupos controle e do PM (teste de Duncan,  $P < 0,05$ ).

### 3.2. Teste de Esquiva Inibitória

A ANOVA de medidas repetidas apontou efeito da sessão [ANOVA de medidas repetidas,  $F(1,43) = 78,00$ ;  $P < 0,000$ ] indicando que ocorreu condicionamento na tarefa de esquiva inibitória, sem, no entanto, haver interação entre a sessão e as condições aplicadas [ANOVA de medidas repetidas Sessão\*PM  $F(1,43) = 0,21$ ; Sessão\*EA  $F(1,43) = 0,41$ ; Sessão\*PM\*EA  $F(1,43) = 0,57$ ]. Não observamos, na comparação dos efeitos entre as variáveis, efeito de nenhuma das condições ([PM  $F(1,43) = 0,33$ ]; [EA  $F(1,43) = 0,005$ ]; [PM\*EA  $F(1,43) = 0,78$ ]).

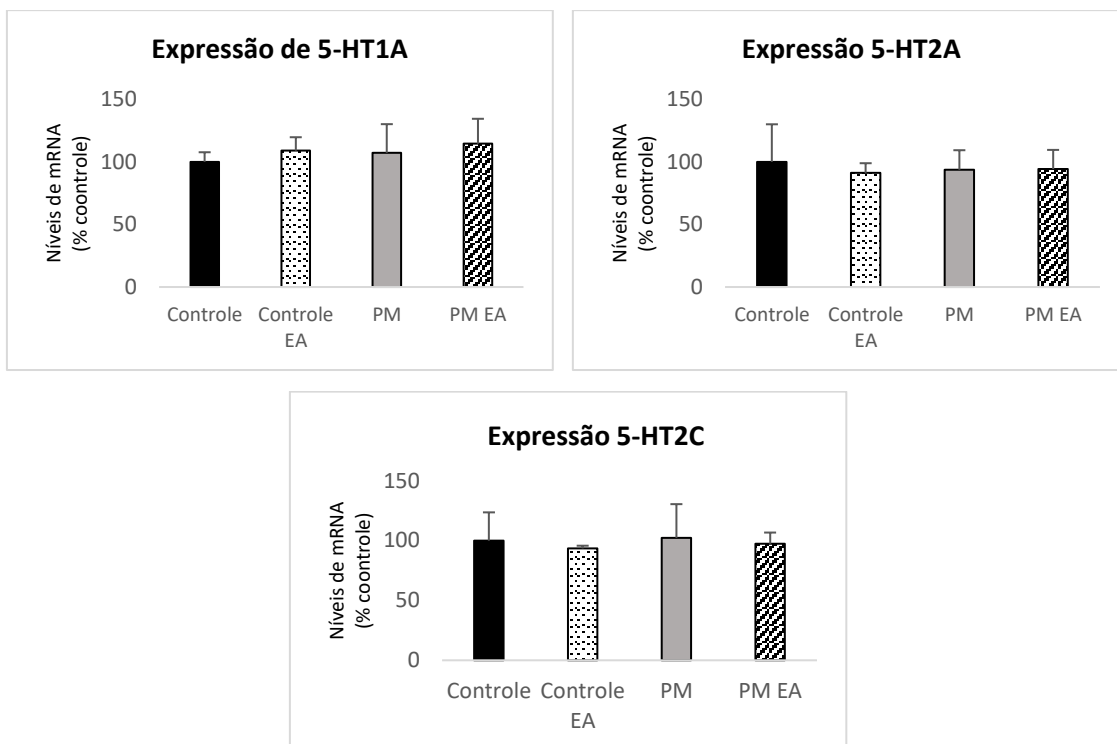


**Figura 9:** Efeito da privação materna e do enriquecimento ambiental no teste de esquiva inibitória. Tempo (em segundos) para descer da plataforma no teste de esquiva inibitória. Dados expressos como média + EPM, N = 13-8 por grupo

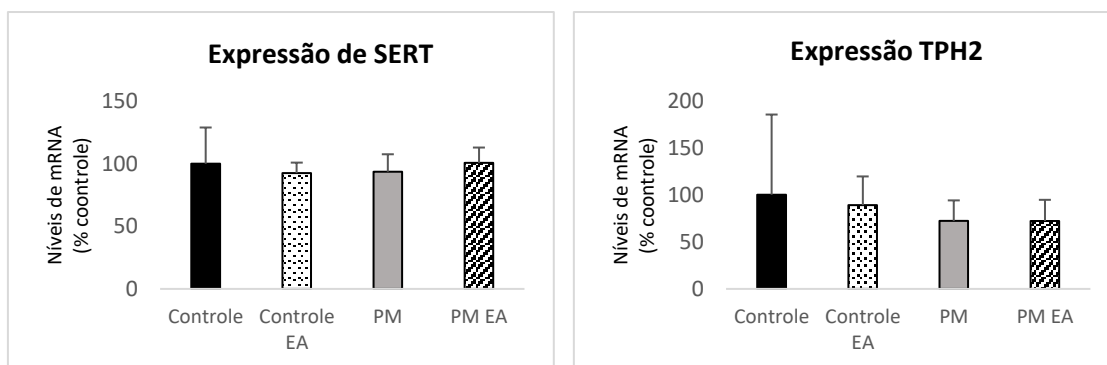
\*: Diferente do dia 1 (ANOVA de medidas repetidas,  $P < 0,05$ ).

### 3.3. Expressão de mRNA de componentes do sistema serotoninérgico na amígdala

A expressão gênica dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> e 5-HT<sub>2C</sub>, na amígdala, não foi alterada pela privação materna, pelo enriquecimento ambiental ou pela interação entre as condições, quando analisados por meio da ANOVA de duas vias - HT1A [PM F: (3,17) = 0,15, EA: F (3,17) = 0,24, PM\*EA: F (3,17) = 0,002]; HT2A [HT2A: PM F: (3,17) = 0,10, EA: F (3,17) = 0,06, PM\*EA: F (3,17) = 0,86]; HT2C [PM F: (3,17) = 0,39, EA: F (3,17) = 0,13, PM\*EA: F (3,17) = 0,002]. Da mesma forma, a expressão do transportador de serotonina e da enzima triptofano hidroxilase não foram alteradas pelas condições - SERT [ANOVA de duas vias, PM F: (3,17) = 0,04, EA: F (3,17) = 0,00, PM\*EA: F (3,17) = 0,23]; TPH2 [PM F: (3,17) = 0,56, EA: F (3,17) = 0,03, PM\*EA: F (3,17) = 0,03].



**Figura 10:** Efeito da privação materna e do enriquecimento ambiental sobre a expressão de mRNA dos receptores do sistema serotoninérgico na amígdala. Dados expressos como média + EPM (% do controle), N = 5-4 por grupo.



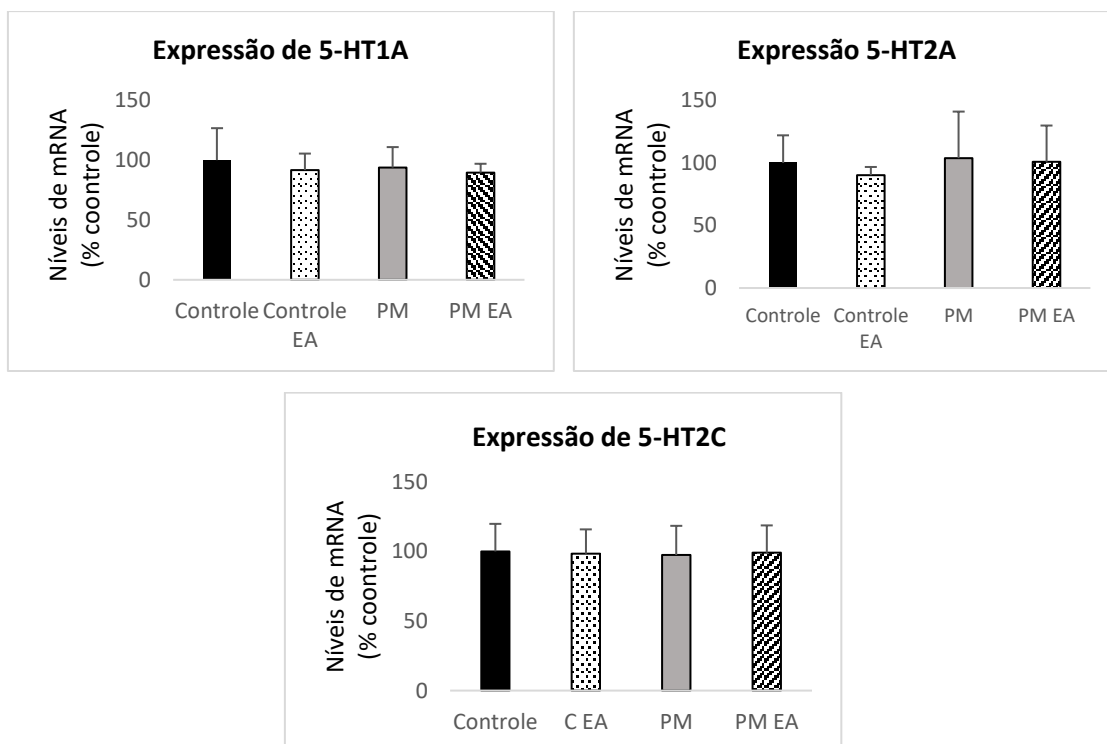
**Figura 11:** Efeito da privação materna e do enriquecimento ambiental sobre a expressão de mRNA do transportador de serotonina e da enzima triptofano hidroxilase na amígdala. Dados expressos como média + EPM (% do controle), N = 5-4 por grupo.

### 3.4. Expressão de mRNA de componentes do sistema serotoninérgico no núcleo dorsal da rafe

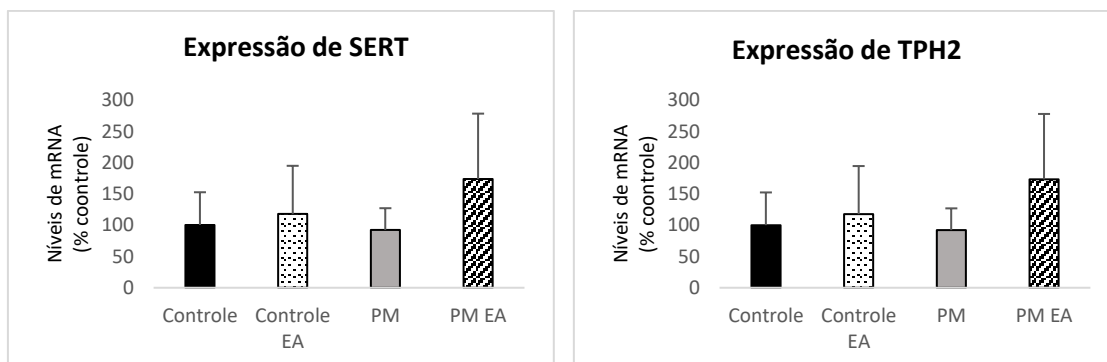
A expressão gênica dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> e 5-HT<sub>2C</sub>, no núcleo dorsal da rafe, não foi alterada pela privação materna, pelo enriquecimento ambiental ou pela interação entre as condições, quando analisados por meio da ANOVA de duas vias - HT1A [PM:  $F(3,19) = 0,71$ , EA  $F(3,19) = 0,16$  PM\*EA  $F$

(3,19) = 0,01]; HT2A [PM: F (3,19) = 0,09, EA F (3,19) = 0,07, PM\*EA F (3,19) = 0,02]; HT2C [PM: F (3,19) = 0,003, EA F (3,19) = 0,000, PM\*EA F (3,19) = 0,009].

Quanto a expressão do transportador de serotonina e da enzima triptofano hidroxilase, não foram observadas alterada provocadas pelas condições - SERT [ANOVA de duas vias, PM: F (3,19) = 0,19, EA F (3,19) = 0,82, PM\*EA F (3,19) = 0,34]; TPH2 [PM: F (3,19) = 0,34, EA F (3,19) = 0,31, PM\*EA F (3,19) = 0,01].



**Figura 12:** Efeito da privação maternal e do enriquecimento ambiental sobre a expressão de mRNA dos receptores do sistema serotoninérgico no núcleo dorsal da rafe. Dados expressos como média + EPM (% do controle), N = 5 por grupo.



**Figura 13:** Efeito da privação maternal e do enriquecimento ambiental sobre a expressão de mRNA do transportador de serotonina e da enzima triptofano hidroxilase no núcleo dorsal da rafe. Dados expressos como média + EPM (% do controle), N = 5 por grupo.

#### 4. DISCUSSÃO

A privação da presença materna pode causar inúmeros prejuízos neuroquímicos e comportamentais, uma vez que durante as duas primeiras semanas de vida são essenciais o cuidado e a proteção do filhote, permitindo seu desenvolvimento saudável. Por outro lado, a exposição ao enriquecimento ambiental promove numerosos benefícios sensoriais, motores e cognitivos em animais de laboratório. Sabendo dos prejuízos que a privação maternal pode provocar e dos benefícios do enriquecimento ambiental, nosso trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do enriquecimento ambiental em animais submetidos à PM nos dias 11 e 13 após o nascimento, bem como avaliar comportamentos relacionados à ansiedade e a expressão gênica de componentes do sistema serotoninérgico.

Observamos que a PM alterou comportamentos relacionados a esquia inibitória, no teste do LTE, porém, não provocou alterações na fuga, no mesmo teste. No TOP, observamos efeito da PM apenas no dia 1 no tempo no compartimento escondido, sem alterações com relação à investigação do pano. Com relação ao EA, observamos aumento de esquia inibitória no LTE, também sem alterações relacionadas à fuga. No TOP, observamos diminuição do tempo no compartimento escondido e aumento do tempo de investigação do pano em todos os dias de teste. Já no teste de esquia inibitória observamos que nenhuma das condições foi capaz de alterar a memória aversiva dos animais. Por fim, a expressão dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2C</sub>, bem como o SERT e a TPH2, não foram alterados na amígdala e no núcleo dorsal da rafe, por nenhuma das condições.

No labirinto em T elevado, observamos diferentes resultados para os dois comportamentos avaliados no teste. O efeito da PM foi melhor evidenciado na esquia 1, o que pode estar relacionado ao efeito tipo-ansiógênico provocado pelo tratamento. O teste do LTE é um teste bem estabelecido para aferição de inibição comportamental. Este comportamento, por sua vez, é evocado quando o animal detecta um estímulo potencial ou um perigo real, localizado a uma distância segura, o que permite reações de defesa (BLANCHARD & BLANCHARD, 1988). De fato, estudos que validaram farmacologicamente o

teste do LTE demonstraram que a administração aguda e sistêmica de compostos ansiolíticos, como, por exemplo o agonista benzodiazepínico diazepam e o agonista parcial de receptores 5-HT<sub>1A</sub>, buspirona, diminuíram a resposta de esquia inibitória. Assim sendo, efeitos observados nas respostas de esquia inibitória estão correlacionados com comportamentos relacionados a ansiedade generalizada (GRAEFF, et al., 1998; BANDELOW, et al., 2012).

O EA, por sua vez, teve seu maior efeito observado na esquia 2, tanto em animais controle como em animais privados. Realmente, a aquisição da esquia está relacionada a ansiedade, porém é esperado que o tempo de saída do braço fechado aumente ao longo das tentativas, devido ao caráter aversivo que esse estímulo apresenta para o animal (ZANGROSSI & GRAEFF, 1997). Desta forma, o aumento do tempo de esquia provocado pelo EA, observado apenas na esquia 2, pode estar relacionado a facilidade de aprendizagem e memória de ambientes aversivos, uma vez que o EA foi capaz de aumentar a esquia 2 tanto no grupo controle quanto no grupo PM. Associado a isso, estudos relatam melhora na aprendizagem e memória em animais submetidos ao EA, o que corrobora nossa hipótese (AHMADALIPOUR et al., 2015).

Poucos estudos encontraram alterações relacionadas à ansiedade em modelos de privação maternal. Burke et al., (2013), por exemplo, realizaram PM em machos e fêmeas no DPN 9 e observaram diferenças entre os sexos. Na idade adulta, machos submetidos ao LCE permaneceram por mais tempo explorando os braços abertos do labirinto, sugerindo efeito ansiolítico e também comportamento de risco aumentado provocado pela PM.

Em contrapartida, Neto et al., (2012), realizaram PM no DPN 11 e avaliaram, em animais adultos, comportamentos relacionados a ansiedade no LTE. Os resultados demonstraram que, tanto em machos quanto em fêmeas, houve aumento do tempo de permanência no compartimento central do LCE e aumento de avaliações de risco, o que reflete um aumento de comportamentos relacionados a ansiedade. Além disso, esses autores ainda observaram alterações nos níveis plasmáticos de corticosterona, e nos níveis hipocâmpais de aspartato, glutamato, GABA e noradrenalina de animais privados, o que justifica o aumento de comportamentos relacionados à ansiedade observado.



Diferente dos protocolos de PM realizados por Burke et al., (2013) e Neto et al., (2012), em nosso estudo a PM foi realizada em dois dias, nos DPN 11 e no DPN 13 o que, possivelmente intensificou os comportamentos relacionados a ansiedade que foram observamos durante a esquivas no LTE.

Ainda no teste do LTE, nas respostas de fuga, não foram observados alterações provocadas pela privação maternal ou pelo enriquecimento ambiental. As respostas de fuga representariam o correlato animal aos ataques de pânico (VIANA et al., 1994; GRAEFF et al., 1998; ZANGROSSI et al., 2001), e, de fato, estudos direcionados à validação farmacológica do LTE através da administração de drogas eficazes no tratamento do transtorno de pânico, demonstraram que estas drogas são capazes de aumentar as latências de fuga do braço aberto do LTE, efeito do tipo panicolítico (POLTRONIERI et al., 2003; PINHEIRO et al., 2008). Sendo assim, nossos resultados indicam que nenhuma das condições foi capaz de provocar comportamentos do tipo pânico.

Os efeitos panicogênicos provocados pelo estresse neonatal foram melhor evidenciados em estudos que utilizam a separação maternal por 180 min diários. Quintino-dos-santos et al., (2014), por exemplo, demonstraram que ratos submetidos à separação da presença materna por 180 min diários ao longo do período de amamentação, apresentam comportamentos classificados como repostas tipo-pânico em modelos de estimulação da substância cinzenta periaquedutal. Recentemente, em nosso grupo de pesquisa, também observamos alterações de respostas de fuga tanto em animais submetidos a separação maternal por 180 min, quanto em animais submetidos a separação maternal por 360 min, porém não observamos alterações em respostas de fuga em animais privados nos dias 11 e 13 após o nascimento (Lima, R. M. S. dados não publicado). Desta forma, podemos sugerir o protocolo de privação maternal nos dias 11 e 13 após o nascimento como um modelo para estudo de comportamentos relacionados à ansiedade generalizada, ao passo que a separação maternal seria mais adequada para o estudo de comportamentos do tipo pânico.

No teste de campo aberto, observamos que a privação maternal não modificou nenhum dos parâmetros analisados, o que corrobora os dados de

Marco et al., (2013), em que não foram verificadas diferenças nos parâmetros analisados no teste.

Em contrapartida, o EA provocou uma diminuição de atividade locomotora tanto na distância total percorrida quanto na peritaxia. O teste do campo aberto é um teste que permite a avaliação do estado emocional do animal frente a um novo ambiente, possibilitando a avaliação da locomoção, exploração e também da ansiedade. Nesse caso, o comportamento é determinado pelo conflito entre a motivação para explorar e a aversão a lugares abertos, desprotegidos e iluminados. O aumento da atividade locomotora, bem como da exploração, está associado ao menor nível de ansiedade (WALSH & CUMMINS, 1976). É importante observar, entretanto, que no protocolo de enriquecimento ambiental os animais são expostos continuamente a um ambiente maior, o que permite maior locomoção e maior atividade exploratória. Dessa forma, a contínua exposição a caixa de enriquecimento ambiental, que possui maior espaço para movimentação, pode ter resultado na redução de atividade locomotora durante a exposição a ambientes novos como o campo aberto.

O TOP parte do princípio de que, roedores quando são expostos a estímulos aversivos, exibem comportamentos de defesa, como maior permanência em compartimentos escondidos e esquiva ao odor do gato, aumento das reações de congelamento, além de redução da atividade exploratória. Desta forma, esse teste consiste em um modelo de indução de ansiedade (DIELENBERG & MCGREGOR, 2001). Neste teste, observamos, conforme o esperado, que todos os animais foram condicionados ao odor do predador, permitindo concluir que o odor do gato foi um estímulo suficientemente aversivo para provocar esquiva ao ambiente em todos os grupos. Além disso, observamos tendência de efeito da PM no tempo do compartimento escondido no primeiro dia de teste, o que não foi observado nas demais sessões.

O medo e a ansiedade são respostas que emergem mais tarde no desenvolvimento de algumas espécies. Em ratos, por exemplo, a resposta defensiva ao odor de predador se desenvolve aproximadamente no DPN 10, quando filhotes começam a andar e deixar o ninho (TAKAHASHI et al., 1991; TAKAHASHI, 1992; WIEDENMAYER & BARR, 2001; MORICEAU et al., 2004).

Sendo assim, é provável que a PM nos dias 11 e 13 não tenha sido capaz de alterar a indução de ansiedade por odor de predadores porque na idade que a PM ocorreu esses comportamentos já haviam sido adquiridos.

Poucos estudos avaliaram a privação maternal em testes de odores de predadores. Recentemente, avaliamos a privação maternal nos DPN 9 e 11 e comparamos com a privação maternal nos DPN 11 e 13, e observamos que a PM nos DPN 9 e 11 provoca mais tempo de investigação do odor do predador em todas as sessões, quando comparado aos grupos controle e PM nos DPN 11 e 13. De fato, esses resultados podem estar diretamente relacionados com o dia em que o estresse neonatal ocorre (Lima, R. M. S. dados não publicado). Desta forma, a PM antes do DPN 10 poderia causar alterações relacionadas com memória aversiva a odores de predadores, enquanto a PM após esse período não parece provocar alterações nesse parâmetro.

Com relação ao EA, observamos que ele foi capaz de reduzir o tempo no compartimento escondido no TOP, provocando simultaneamente aumento no tempo de investigação ao pano. Esse efeito foi observado em todas as sessões, o que indica que os animais foram condicionados ao odor do predador mas ainda assim permaneceram mais tempo realizando atividade de exploração quando comparado aos outros grupos. O maior tempo de exploração do pano pode estar associado com o aumento da investigação de objetos, uma vez que nosso protocolo de EA proporcionou exposição a novos objetos semanalmente, o que permitiu uma habituação à exploração de novos objetos. Além disso, diversos estudos mostram melhora de padrões cognitivos provocados pelo EA, como memória, como nós também observamos com o passar das sessões (TANG et al., 2001; BRUEL-JUNGERMAN et al., 2005; HUANG et al., 2007).

Não houve diferença entre as condições no teste de esquiva inibitória. Esse teste consiste em uma tarefa comumente usada para investigar processos de aprendizagem e memória em roedores (GOLD, 1986; MCGAUGH & ROOZENDAAL, 2009). Conforme observado em nossos testes anteriores, nenhum dos comportamentos relacionados a aprendizagem foi alterado, desta forma, podemos confirmar que os resultados encontrados tanto no LTE, quanto

no TOP, estão diretamente relacionados a ansiedade, não havendo relação com alterações em memória aversiva.

Os componentes do sistema serotoninérgico avaliados não foram alterados na amígdala e no núcleo dorsal da rafe por nenhuma das condições. Entretanto, como o sistema serotoninérgico está amplamente distribuído no SNC, os efeitos comportamentais observados podem ter sido resultado de alterações em outras regiões encefálicas que também contribuirão para esses comportamentos. Efetivamente, sabe-se que 5-HT é um neurotransmissor implicado em muitas atividades encefálicas, que incluem humor, ansiedade, dor e comportamento sexual (CASES et al., 1995; HARDAKER et al., 2001; MIDDLEMISS et al., 2002). Além disso, o sistema serotoninérgico está amplamente distribuído no sistema nervoso central, uma vez que corpos celulares de neurônios serotoninérgicos, localizados nos núcleos da rafe do tronco encefálico, projetam-se para diversas áreas encefálicas, como o córtex pré-frontal, glândulas da base, cerebelo, tálamo, áreas límbicas, hipocampo, hipotálamo, amígdala e medula espinhal (VISSER et al., 2011).

Além disso, estudos demonstram a relação do estresse com o sistema serotoninérgico, e evidências da presença de terminais nervosos serotoninérgicos em áreas encefálicas relacionadas ao estresse, como hipocampo e hipotálamo, suportam essa hipótese (CHAOULOFF et al., 1999). Ao mesmo tempo, uma recente revisão de literatura, abordando diferentes tipos de estresse crônico, evidenciou que diferentes modelos animais de estresse causam alterações no sistema serotoninérgico, causando, por exemplo, a diminuição dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> pré-sinápticos no núcleo dorsal da rafe (MAHAR et al., 2014).

Nossos dados são os primeiros na literatura associando dois dias de privação maternal com comportamentos relacionados à ansiedade e ao sistema serotoninérgico. Vázquez e colaboradores (2000), realizaram PM nos dias pós-natal 6, 9 e 12 a fim de comparar os efeitos imediatos da PM em diferentes dias de desenvolvimento. Esses autores avaliaram os níveis de ACTH e corticosterona, além dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> e o transportador de 5-HT, no hipocampo, núcleo dorsal rafe e córtex parietal. Nesse estudo, foram

observados elevados níveis plasmáticos de ACTH e corticosterona em todos os dias de PM. Além disso, os níveis de mRNA dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> no hipocampo foram dependentes da idade, sendo aumentados principalmente na PM nos dias 9 e 12. Do mesmo modo, a privação materna também causou um aumento de mRNA dos receptores 5-HT<sub>2A</sub> no córtex cerebral nos dias 9 e 12. No núcleo dorsal da rafe houve um efeito significativo da idade nos receptores 5-HT<sub>1A</sub> e no transportador de serotonina; no entanto, a PM não provocou alterações nesses componentes.

Além disso, Rentesi et al (2010), realizaram PM no DPN 9 e observaram aumento da atividade serotoninérgica no hipotálamo, dos níveis plasmáticos de corticosterona e ACTH, bem como de comportamentos relacionados à ansiedade. Rentesi et al (2013), por sua vez, avaliaram os níveis de serotonina e seus metabólitos no córtex pré-frontal, amígdala e estriado, em animais adultos que foram submetidos a PM no DPN 9, e observaram uma redução do conteúdo de serotonina (5-HT) no córtex pré-frontal e na amígdala, e da expressão do receptor 5-HT<sub>2A</sub> no corpo estriado e aumento na amígdala. Já Llorente et al. (2010), avaliaram os efeitos do estresse neonatal nos níveis de serotonina no córtex pré-frontal, hipocampo, estriado, mesencéfalo e cerebelo de animais adolescentes, e verificaram aumento dos níveis de 5-HT nas regiões estudadas, com exceção do cerebelo. Esses resultados suportam nossa hipótese de que a ausência de alterações na expressão gênica do sistema serotoninérgico nas áreas analisadas está relacionada a alterações em outras áreas que também são importantes para os comportamentos avaliados.

É bem sabido que a desregulação do eixo HHA e do sistema serotoninérgico está associada a distúrbios como depressão, transtornos de ansiedade e obesidade (HEISLER, et al., 2007), uma vez que o sistema serotoninérgico regula mecanismos de liberação hormonal, a partir da ativação de seus receptores no núcleo paraventricular do hipotálamo, participando assim do controle do eixo HHA (SAPHIER, et al., 1994). Além disso, estudos anteriores evidenciam que os protocolos de estresse neonatal estão associados a psicopatologias em animais adultos, tais como depressão e distúrbios de ansiedade (HEIM et al., 1997). Um grande número desses estudos relaciona

esses resultados com alterações no eixo HHA (FRANCIS et al., 1999; HUOT et al., 2001; MACRI & WURBEL, 2007; LEE et al., 2014).

De fato, desde a década de 90, uma extensa literatura investiga as consequências de curto e longo prazo da privação maternal, uma vez que, durante as duas primeiras semanas de vida, existe um período de hiporresponsividade ao estresse, no qual o nível glicocorticoide é estável, e importante para o desenvolvimento neuronal (SAPOLSKY & MEANEY, 1986; ROTS et al., 1996; VAN OERS et al., 1997). A PM, bem como outros protocolos de estresse neonatal, é capaz de provocar aumento da liberação de glicocorticoides, mesmo durante esse período, o que pode levar a consequências duradouras no controle do eixo HHA (SAPOLSKY & MEANEY, 1986; LAJUD et al., 2012). Logo, as alterações encontradas em nosso estudo também podem estar relacionadas a alterações no eixo HHA, uma vez que todos os testes realizados estão diretamente relacionados a reações frente a estresse.

Com relação aos efeitos do EA em animais, são encontrados diferentes resultados na literatura, alguns até mesmo contraditórios, o que podem estar relacionados com a variação na execução desses protocolos (HULLINGER, et al., 2015). Tanto que, diante de vários estudos realizados com o EA, a literatura ainda não se tem um consenso sobre qual protocolo seria ideal para atingir os efeitos benéficos do EA no cérebro e no comportamento dos animais (VAN PRAAG et al., 2000; NITHIANANTHARAJAH e HANNAN, 2006; HUANG, et al., 2007; LLORENS-MARTÍN et al., 2007; XU et al., 2009; MESA-GRESA, et al., 2013).

O desenvolvimento anatômico, químico e fisiológico do encéfalo, e consequentemente do comportamento, é decorrente da interação entre fatores genéticos e ambientais. A maturação do sistema nervoso depende de três fatores críticos: fatores genéticos, relacionados a hereditariedade, fatores relacionados a estimulação ambiental e a nutrição adequada e equilibrada (MORGANE et al., 1993). Em nosso estudo avaliamos dois importantes fatores relacionados ao ambiente, o enriquecimento ambiental e a privação maternal. A PM se constituiu de uma manipulação em apenas dois dias do desenvolvimento, que foi capaz de produzir resultados comportamentais na vida adulta. Ao mesmo

tempo, enriquecimento ambiental foi capaz de aumentar o aprendizado dos animais, bem como a investigação e atividade exploratória, sem, no entanto, atenuar os efeitos induzidos pela PM. Em conjunto, nossos resultados demonstram que a PM nos dias 11 e 13 após o nascimento se constitui de um modelo para estudo da ansiedade generalizada, ao passo que o EA pode representar uma melhor ferramenta para estudo de comportamentos relacionados a memória e aprendizagem. Além disso, embora não tenhamos observado alterações na expressão de componentes do sistema serotoninérgico na amígdala e no núcleo dorsal da rafe, sugerimos que as duas condições podem provocar alterações na expressão gênica de outras áreas encefálicas, como no hipocampo e no córtex pré-frontal, as quais recebem projeções da amígdala e do núcleo dorsal da rafe, e estão envolvidas em comportamentos relacionados a ansiedade.

De acordo com o exposto, podemos concluir que ambas as condições provocam efeitos ansiogênicos sem alterar a memória aversiva, mas apenas o EA provoca alterações na resposta a novos ambientes e contextos, e apesar do notório envolvimento da rafe dorsal e da amígdala com a ansiedade, a neurotransmissão serotoninérgica nestas estruturas não é alterada pela privação maternal e pelo enriquecimento ambiental.

## 5. CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram que não há conflito de interesse.

## 6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Prof. Dra. Vanessa Beijamini Harres, do Departamento de Ciências Farmacêutica, e ao Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg, do departamento de Ciências Fisiológicas da UFES, pelo empréstimo de aparatos e equipamentos necessários para a realização dos experimentos. E também a CAPES, a FAPES, ao CNPQ pelo suporte financeiro.

## 7. REFERÊNCIAS

AHMADALIPOUR, A.; SADEGHZADEH, J.; VAFAEI, A. A.; BANDEGI, A. R.; MOHAMMADKHANI, R.; RASHIDY-POUR, A. Effects of environmental enrichment on behavioral deficits and alterations in hippocampal BDNF induced by prenatal exposure to morphine in juvenile rats. **Neuroscience**, v. 305, p. 372–383, 2015.

APFELBACH, R.; BLANCHARD, C. D.; BLANCHARD, R. J.; HAYES, R. A.; MCGREGOR, I. S. The effects of predator odors in mammalian prey species: A review of field and laboratory studies. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 8, p. 1123–1144, 2005.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: A review. **Animal Behaviour**, v. 21, n. 2, p. 205–235, 1973.

BANDELOW, B.; SHER, L.; BUNEVICIUS, R.; HOLLANDER, E.; KASPER, S.; ZOHAR, J.; MÖLLER, H.-J. Guidelines for the pharmacological treatment of anxiety disorders, obsessive–compulsive disorder and posttraumatic stress disorder in primary care. **International Journal of Psychiatry in Clinical Practice**, v. 16, n. 2, p. 77–84, 2012.

BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. ETHOEXPERIMENTAL APPROACHES TO THE BIOLOGY OF EMOTION. **Defense**, v. 39, p. 43–68, 1988.

BRUEL-JUNGERMAN, E.; LAROCHE, S.; RAMPON, C. New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. **European Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 2, p. 513–521, 2005.

BURKE, N. N.; LLORENTE, R.; MARCO, E. M.; TONG, K.; FINN, D. P.; VIVEROS, M.; ROCHE, M. Maternal Deprivation Is Associated With Sex-Dependent Alterations in Nociceptive Behavior and Neuroinflammatory Mediators in the Rat Following Peripheral Nerve Injury. **The Journal of Pain**, v. 14, n. 10, p. 1173–1184, 2013.



CASES, O.; SEIF, I.; GRIMSBY, J.; GASPAR, P.; CHEN, K.; POURNIN, S.; MÜLLER, U.; AGUET, M.; BABINET, C.; SHIH, J. C. Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAOA. **Science (New York, N.Y.)**, v. 268, n. 5218, p. 1763–6, 1995.

CHAOULOFF, F.; BERTON, O.; MORMÈDE, P. Serotonin and stress coping. **Behavioural Brain Research**, v. 277, n. 99, p. 58–67, 1999.

CHARPAK, N.; RUIZ-PELA, J. G. Kangaroo Mother Versus Traditional Care for Newborn Infants. **Pediatrics**, v. 100, n. 4, p. 682–688, 1997.

COURVOISIER, H.; MOISAN, M.P.; SARRIEAU, A.; HENDLEY, E.D.; MORMÈDE, P. Behavioral and neuroendocrine reactivity to stress in the WKHA/WKY inbred rat strains: a multifactorial and genetic analysis. **Brain Research**, v. 743, n. 1-2, p. 77-85, 1996.

DEAKIN, J.W.F.; GRAEFF, F.G. 5-HT and mechanisms of defense. **J Psychopharmacol**, v. 5, p. 305–315, 1991.

DIELENBERG, R. A.; MCGREGOR, I. S. Defensive behavior in rats towards predatory odors: A review. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 7-8, p. 597–609, 2001.

DUBOIS, J.; DEHAENE-LAMBERTZ, G.; KULIKOVA, S.; POUPON, C.; HÜPPI, P. S.; HERTZ-PANNIER, L. The early development of brain white matter: A review of imaging studies in fetuses, newborns and infants. **Neuroscience**, v. 276, p. 48-71, 2014.

ELLENBROEK, B. A.; DE BRUIN, N. M. W. J.; VAN DEN KROONENBURG, P. T. J. M.; VAN LUIJTELAAR, E. L. J. M.; COOLS, A. R. The effects of early maternal deprivation on auditory information processing in adult wistar rats. **Biological Psychiatry**, v. 55, n. 7, p. 701–707, 2004.

FATURI, C. B.; TIBA, P. A.; KAWAKAMI, S. E.; CATALLANI, B.; KERSTENS, M.; SUCHECKI, D. Disruptions of the mother-infant relationship and stress-related behaviours: Altered corticosterone secretion does not explain everything. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 34, n. 6, p. 821–834, 2010.

FILHO, G. L. B.; ZENKI, K. C.; KALININE, E.; BAGGIO, S.; PETTENUZZO, L.; ZIMMER, E. R.; WEIS, S. N.; CALCAGNOTTO, M. E.; ONOFRE DE SOUZA, D. A New Device for Step-Down Inhibitory Avoidance Task—Effects of Low and High Frequency in a Novel Device for Passive Inhibitory Avoidance Task That Avoids Bioimpedance Variations. **Plos One**, v. 10, n. 2, p. e0116000, 2015.

FRANCIS, D. D.; CHAMPAGNE, F. a; LIU, D.; MEANEY, M. J. Maternal care, gene expression, and the development of individual differences in stress reactivity. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 896, p. 66–84, 1999.

GELLER, I.; SEIFTER, J. The effects of meprobamate, barbiturates, danphetamine and promazine on experimentally induced conflict in the rat. **Psychopharmacology**, v. 1, p. 482-492, 1960.

GOLD, P. E. The use of avoidance training in studies of modulation of memory storage. **Behavioral and Neural Biology**, v. 46, n. 1, p. 87–98, 1986.

GRAEFF, F. G.; FERREIRA NETTO, C.; ZANGROSSI, H. The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 2, p. 237–246, 1998

HARDAKER, L. A.; SINGER, E.; KERR, R.; ZHOU, G.; SCHAFER, W. R. Serotonin modulates locomotory behavior and coordinates egg-laying and movement in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Neurobiology**, v. 49, n. 4, p. 303–313, 2001.

HEBB, D. O. The effects of early experience on problemsolving at maturity. **Am. Psychol**, v. 2, p. 306–307, 1947

HEIM, C.; NEMEROFF, C. B. The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. **Biological Psychiatry**, v. 49, p. 1023–1039, 2001.

HEIM, C.; OWENS, M. J.; PLOTSKY, P. M.; NEMEROFF, C. B. The Role of Early Adverse Life Events in the Etiology of Depression and Posttraumatic Stress Disorder. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 821: 194–207, 1997.

HEISLER, L. K.; PRONCHUK, N.; NONOGAKI, K.; ZHOU, L.; RABER, J.; TUNG, L.; YEO, G. S. H.; O'RAHILLY, S.; COLMERS, W. F.; ELMQUIST, J. K.; TECOTT, L. H. Serotonin Activates the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis via Serotonin 2C Receptor Stimulation. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 26, p. 6956–6964, 2007.

HUANG, F. L.; HUANG, K.-P.; WU, J.; BOUCHERON, C. Environmental Enrichment Enhances Neurogranin Expression and Hippocampal Learning and Memory But Fails to Rescue the Impairments of Neurogranin Null Mutant Mice. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 26, n. 23, p. 6230–6237, 2007.

HULLINGERB, R.; O'RIORDANC, K.; BURGER, C. Environmental enrichment improves learning and memory and long-term potentiation in young adult rats through a mechanism requiring mGluR5 signaling and sustained activation of p70s6k. **Neurobiol Learn Mem**, v. 125, n. 2, p. 126–134, 2015.

HUOT, R.L.; THRIVIKRAMAN, K. V.; MEANEY, M.J.; PLOTSKY, P.M. Development of adult ethanol preference and anxiety as a consequence of neonatal maternal separation in Long Evans rats and reversal with antidepressant treatment. **Psychopharmacology (Berl)**. 158, 366–73, 2001.

KONKLE, A. T. M.; KENTNER, A. C.; BAKER, S. L.; STEWART, A.; BIELAJEW, C. Environmental-Enrichment-Related Variations in Behavioral, Biochemical, and Physiologic Responses of Sprague-Dawley and Long Evans Rats. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 49, n. 4, p. 427–436, 2010.

KULESSKAYA, N.; RAUVALA, H.; VOIKAR, V. Evaluation of social and physical enrichment in modulation of behavioural phenotype in C57BL/6J female mice. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, 2011.

LAJUD, N.; ROQUE, A.; CAJERO, M.; GUTIÉRREZ-OSPINA, G.; TORNER, L. Periodic maternal separation decreases hippocampal neurogenesis without affecting basal corticosterone during the stress hyporesponsive period, but alters HPA axis and coping behavior in adulthood. **Psychoneuroendocrinology**, v. 37, n. 3, p. 410–420, 2012.

LAMBAS-SENAS, L.; MNIE-FILALI, O.; CERTIN, V.; FAURE, C.; LEMONE, L.; ZIMMER, L.; HADDJERI, N. Functional correlates for 5-HT<sub>1A</sub> receptors in maternally deprived rats displaying anxiety and depression-like behav.s. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biol Psychiatry**, v. 33, p. 262–268, 2009.

LAVIOLA, G.; HANNAN, A. J.; MACRÌ, S.; SOLINAS, M.; JABER, M. Effects of enriched environment on animal models of neurodegenerative diseases and psychiatric disorders. **Neurobiology of Disease**, v. 31, n. 2, p. 159–168, 2008

LEE, J.-H.; KIM, H. J.; KIM, J. G.; RYU, V.; KIM, B.-T.; KANG, D.-W.; JAHNG, J. W. Depressive behaviors and decreased expression of serotonin reuptake transporter in rats that experienced neonatal maternal separation. **Neuroscience Research**, v. 58, n. 1, p. 32–39, 2007.

LEE, R.; SAWA, A. Environmental stressors and epigenetic control of the hypothalamic-pituitary-adrenal-axis (HPA-axis). **Neuroendocrinology**, v. 100, n. 4, p. 278–287, 2014.

LEGER, M.; QUIEDEVILLE, A.; PAIZANIS, E.; NATKUNARAJAH, S.; FRERET, T.; BOULOUARD, M.; SCHUMANN-BARD, P. Environmental Enrichment Enhances Episodic-Like Memory in Association with a Modified Neuronal Activation Profile in Adult Mice. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, 2012.

LLORENS-MARTÍN, M. V.; RUEDA, N.; MARTÍNEZ-CUÉ, C.; TORRES-ALEMÁN, I.; FLÓREZ, J.; TREJO, J. L. Both increases in immature dentate neuron number and decreases of immobility time in the forced swim test occurred in parallel after environmental enrichment of mice. **Neuroscience**, v. 147, n. 3, p. 631–638, 2007.

LLORENTE, R.; MIGUEL-BLANCO, C.; AISA, B.; LACHIZE, S.; BORCEL, E.; MEIJER, O. C.; RAMIREZ, M. J.; DE KLOET, E. R.; VIVEROS, M. P. Long Term Sex-Dependent Psychoneuroendocrine Effects of Maternal Deprivation and Juvenile Unpredictable Stress in Rats. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 23, n. 4, p. 329–344, 2011.

LLORENTE, R.; O'SHEA, E.; GUTIERREZ-LOPEZ, M. D.; LLORENTE-BERZAL, A.; COLADO, M. I.; VIVEROS, M. P. Sex-dependent maternal deprivation effects on brain monoamine content in adolescent rats. **Neuroscience Letters**, v. 479, n. 2, p. 112–117, 2010.

LLORENTE-BERZAL, A.; FUENTES, S.; GAGLIANO, H.; LÓPEZ-GALLARDO, M.; ARMARIO, A.; VIVEROS, M. P.; NADAL, R. Sex-dependent effects of maternal deprivation and adolescent cannabinoid treatment on adult rat behaviour. **Addiction Biology**, v. 16, n. 4, p. 624–637, 2011.

MACRÌ, S.; WÜRBEL, H. Environmental modulation of maternal behavior and behavioural and HPA-responses in rats. **Anim. Behav**, v. 73, p. 171-184, 2007.

MAHAR, I.; BAMBICO, F. R.; MECHAWAR, N.; NOBREGA, J. N. Stress, serotonin, and hippocampal neurogenesis in relation to depression and antidepressant effects. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 38, p. 173–192, 2014.

MARCO, E. M.; LLORENTE, R.; LOPEZ-GALLARDO, M.; MELA, V.; LLORENTE-BERZAL, A.; PRADA, C.; VIVEROS, M.-P. The maternal deprivation animal model revisited. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 51, p. 151–163, 2015.

MARCO, E. M.; VALERO, M.; DE LA SERNA, O.; AISA, B.; BORCEL, E.; RAMIREZ, J. M.; VIVEROS, M. Maternal deprivation effects on brain plasticity and recognition memory in adolescent male and female rats. **Neuropharmacology**, v. 68, p. 223–231, 2013.

MATTO, V.; ALLIKMETS, L. Acute and chronic citalopram treatment differently modulates rat exploratory behavior in the exploration box test: no evidence for increased anxiety or changes in the [3H]raclopride binding. **Pharmacology**, v. 58, n. 2, p. 59-69. 1999.

MCGAUGH, J. L.; ROOZENDAAL, B. Drug enhancement of memory consolidation: Historical perspective and neurobiological implications. **Psychopharmacology**, v. 202, n. 1-3, p. 3–14, 2009.

MENEZES, G. B. De; FONTENELLE, L. F.; MULULO, S.; VERSIANI, M. Treatment-resistant anxiety disorders: social phobia, generalized anxiety disorder and panic disorder. **Rev Bras Psiquiatria**, v. 29, n. Supl II, p. 55–60, 2007.

MESA-GRESA, P.; PÉREZ-MARTINEZ, A.; REDOLAT, R. Environmental enrichment improves novel object recognition and enhances agonistic behavior in male mice. **Aggressive Behavior**, v. 39, n. 4, p. 269–279, 2013.

MIDDLEMISS, D. N.; PRICE, G. W.; WATSON, J. M. Serotonergic targets in depression. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 2, n. 1, p. 18–22, 2002.

MORGANE, P. J.; AUSTIN-LAFRANCE, R.; BRONZINO, J.; TONKISS, J.; DÍAZ-CINTRA, S.; CINTRA, L.; KEMPER, T.; GALLER, J. R. Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 17, n. 1, p. 91–128, 1993.

MORICEAU, S.; ROTH, T. L.; OKOTOGHAIDE, T.; SULLIVAN, R. M. Corticosterone controls the developmental emergence of fear and amygdala

function to predator odors in infant rat pups. **Clinical Lymphoma**, v. 9, n. 1, p. 19–22, 2004.

NETO, J. B. B.; TIBA, P. A.; FATURI, C. B.; DE CASTRO-NETO, E. F.; DA GRAA NAFFAH-MAZACORATTI, M.; DE JESUS MARI, J.; DE MELLO, M. F.; SUCHECKI, D. Stress during development alters anxiety-like behavior and hippocampal neurotransmission in male and female rats. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 518–526, 2012.

NITHIANANTHARAJAH, J.; HANNAN, A. J. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 7, n. 9, p. 697–709, 2006.

PAXINOS G., WATSON C., 1986. The rat brain in stereotaxic coordinates. Sydney: Academy.

PINHEIRO, S. N.; DEL-BEN, C. M.; ZANGROSSI, H.; GRAEFF, F. G. Anxiolytic and panicolytic effects of escitalopram in the elevated T-maze. **Journal of psychopharmacology (Oxford, England)**, v. 22, n. 2, p. 132–7, 2008.

POLTRONIERI, S. C.; ZANGROSSI, H.; DE BARROS VIANA, M. Antipanic-like effect of serotonin reuptake inhibitors in the elevated T-maze. **Behavioural Brain Research**, v. 147, n. 1-2, p. 185–192, 2003.

QUINTINO-DOS-SANTOS, J. W.; MÜLLER, C. J. T.; BERNABÉ, C. S.; ROSA, C. A.; TUFIK, S.; SCHENBERG, L. C. Evidence that the periaqueductal gray matter mediates the facilitation of panic-like reactions in neonatally-isolated adult rats. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, 2014.

RENTESI, G.; ANTONIOU, K.; MARSELOS, M.; FOTOPOULOS, A.; ALBOYCHARALI, J.; KONSTANDI, M. Long-term consequences of early maternal deprivation in serotonergic activity and HPA function in adult rat. **Neuroscience Letters**, v. 480, n. 1, p. 7–11, 2010.

RENTESI, G.; ANTONIOU, K.; MARSELOS, M.; SYRROU, M.; PAPADOPOULOU-DAIFOTI, Z.; KONSTANDI, M. Early maternal deprivation-induced modifications in the neurobiological, neurochemical and behavioral profile of adult rats. **Behavioural Brain Research**, v. 244, p. 29–37, 2013.

ROTS, N. Y.; DE JONG, J.; WORKEL, J. O.; LEVINE, S.; COOLS, A. R.; DE KLOET, E. R. Neonatal maternally deprived rats have as adults elevated basal pituitary-adrenal activity and enhanced susceptibility to apomorphine. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 8, n. 7, p. 501–506, 1996.

SÁNCHEZ, M.M.; LADD, C.O. PLOTSKY PM. Early adverse experience as a developmental risk factor for later psychopathology: evidence from rodent and primate models. **Dev Psychopathol**, v. 13(3), p. 419-449, 2001.

SAPHIER, D.; WELCH, J. O. N. E.; FARRAR, G. E.; NGUYEN, N. H. U. Q.; AGUADO, F.; THALLER, T. R.; KNIGHTS, D. S. Interactions between serotonin, thyrotropin-releasing hormone, and substance p in the CNS regulation of

adrenocortical secretion. **Psychoneuroendocrinology**, v. 19, n. 8, p. 779–797, 1994.

SAPOLSKY, R. M.; MEANEY, M. J. Maturation of the adrenocortical stress response: Neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. **Brain Research**

SCHMIDT, M. V.; OITZL, M. S.; LEVINE, S.; DE KLOET, E. R. The HPA system during the postnatal development of CD1 mice and the effects of maternal deprivation. **Developmental Brain Research**, v. 139, p. 39-49, 2002.

SULLIVAN, R.M. Developing a sense of safety: the neurobiology of neonatal attachment. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1008, 122–31, 2003.

TAKAHASHI, L. K. Ontogeny of behavioral inhibition induced by unfamiliar adult male conspecifics in preweanling rats. **Physiology and Behavior**, v. 52, n. 3, p. 493–498, 1992.

TAKAHASHI, L. K.; TURNER, J. G.; KALIN, N. H. Development of Stress-Induced Responses in Prewanling < Rats. **Developmental Psychobiology**, v. 24, n. 5, p. 341–360, 1991.

TANG, Y. P.; WANG, H.; FENG, R.; KYIN, M.; TSIEN, J. Z. Differential effects of enrichment on learning and memory function in NR2B transgenic mice. **Neuropharmacology**, v. 41, n. 6, p. 779–790, 2001.

VAN OERS, H. J. J.; RONALD DE KLOET, E.; LEVINE, S. Persistent, but Paradoxical, Effects on HPA Regulation of Infants Maternally Deprived at Different Ages. **Stress: The International Journal on the Biology of Stress**, v. 1, n. 4, p. 249–261, 1997.

VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F. H. Neural consequences of environmental enrichment. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 1, n. December, p. 191–198, 2000.

VÁZQUEZ, D. M.; LÓPEZ, J. F.; VAN HOERS, H.; WATSON, S. J.; LEVINE, S. Maternal deprivation regulates serotonin 1A and 2A receptors in the infant rat. **Brain Research**, v. 855, n. 1, p. 76–82, 2000.

VEDOVELLI, K.; SILVEIRA, E.; VELHO, E.; STERTZ, L.; KAPCZINSKI, F.; SCHRÖDER, N.; BROMBERG, E. Effects of increased opportunity for physical exercise and learning experiences on recognition memory and brain-derived neurotrophic factor levels in brain and serum of rats. **Neuroscience**, v. 199, p. 284–291, 2011.

VIANA, M. B.; TOMAZ, C.; GRAEFF, F. G. The elevated T-maze: A new animal model of anxiety and memory. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 49, n. 3, p. 549–554, 1994.

VISSER, A. K. D.; VAN WAARDE, A.; WILLEMSSEN, A. T. M.; BOSKER, F. J.; LUITEN, P. G. M.; DEN BOER, J. A.; KEMA, I. P.; DIERCKX, R. A. J. O. Measuring serotonin synthesis: From conventional methods to PET tracers and

their (pre)clinical implications. **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v. 38, n. 3, p. 576–591, 2011.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A.; BUDTZ-OLSEN, O.; EICHELMAN, B.; HORVATH, T.; LEE, A. The Open-Field Test: A Critical Review. **Psychological Bulletin**, v. 83, n. 3, p. 482–504, 1976.

WIDMAN, D. R.; ROSELLINI, R. A. Restricted daily exposure to environmental enrichment increases the diversity of exploration. **Physiology and Behavior**, v. 47, n. 1, p. 57–62, 1990.

WIEDENMAYER, C. P.; BARR, G. A. Developmental changes in c-fos expression to an age-specific social stressor in infant rats. **Behavioural Brain Research**, v. 126, n. 1-2, p. 147–157, 2001.

XU, Z.; HOU, B.; ZHANG, Y.; GAO, Y.; WU, Y.; ZHAO, S.; ZHANG, C. Antidepressive behaviors induced by enriched environment might be modulated by glucocorticoid levels. **European Neuropsychopharmacology**, v. 19, n. 12, p. 868–875, 2009.

ZANGROSSI, H.; GRAEFF, F. G. Behavioral validation of the elevated T-maze, a new animal model of anxiety. **Brain Research Bulletin**, v. 44, n. 1, p. 1–5, 1997.

ZANGROSSI, H.; GRAEFF, F. G. Behavioral validation of the elevated T-maze, a new animal model of anxiety. **Brain Research Bulletin**, v. 44, n. 1, p. 1–5, 1997.

ZANGROSSI, H.; VIANA, M. B.; ZANOVELI, J.; BUENO, C.; NOGUEIRA, R. L.; GRAEFF, F. G. Serotonergic regulation of inhibitory avoidance and one-way escape in the rat elevated T-maze. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 7-8, p. 637–645, 2001.

## *Conclusões*



## CONCLUSÕES

- A privação maternal e o enriquecimento ambiental aumentaram o tempo de esquia no LTE, porém nenhuma das condições modificou os comportamentos de fuga. Indicando que as duas condições provocaram efeitos tipo-ansiosos;
- A privação maternal não provocou mudanças de atividade locomotora no CA, em contrapartida, o enriquecimento ambiental diminuiu a atividade locomotora em todos os parâmetros avaliados;
- A privação maternal não provocou alterações no TOP, e o enriquecimento ambiental causou diminuição do tempo no compartimento escondido e aumento do tempo de investigação do pano;
- A privação maternal e o enriquecimento ambiental não alteraram a memória aversiva no teste de esquia inibitória, confirmando os achados no TOP e no LTE;
- A privação maternal nos dias 11 e 13 após o nascimento e o enriquecimento ambiental contínuo não provocaram alterações na expressão de mRNA de componentes do sistema serotoninérgico na amígdala e no núcleo dorsal da rafe.



## *Referências Bibliográficas*

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMADALIPOUR, A.; SADEGHZADEH, J.; VAFAEI, A. A.; BANDEGI, A. R.; MOHAMMADKHANI, R.; RASHIDY-POUR, A. Effects of environmental enrichment on behavioral deficits and alterations in hippocampal BDNF induced by prenatal exposure to morphine in juvenile rats. **Neuroscience**, v. 305, p. 372–383, 2015.

American Psychiatry Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental disorders - DSM-5. 5th.ed. **Washington: American Psychiatric Association**, 2013.

ANDRADE, L. H.; WANG, Y. P.; ANDREONI, S.; SILVEIRA, C. M.; ALEXANDRINO-SILVA, C.; SIU, E. R.; NISHIMURA, R.; ANTHONY, J. C.; GATTAZ, W. F.; KESSLER, R. C.; VIANA, M. C. Mental disorders in megacities: Findings from the São Paulo megacity mental health survey, Brazil. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, 2012.

ANDRADE, R.; BARNES, N. M.; BAXTER, G.; BOCKAERT, J. BRANCHEK, T.; COHEN, M. L. 5-hydroxytryptamine receptors. IUPHAR database. Acessado em: 08/05/2017, em: <http://www.iuphar-db.org/DATABASE/FamilyMenuForward?familyId=1>.

APFELBACH, R.; BLANCHARD, C. D.; BLANCHARD, R. J.; HAYES, R. A.; MCGREGOR, I. S. The effects of predator odors in mammalian prey species: A review of field and laboratory studies. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 8, p. 1123–1144, 2005.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: A review. **Animal Behaviour**, v. 21, n. 2, p. 205–235, 1973.

ASAN, E.; STEINKE, M.; LESCH, K. P. Serotonergic innervation of the amygdala: Targets, receptors, and implications for stress and anxiety. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 139, n. 6, p. 785–813, 2013.

BANDELOW, B.; SHER, L.; BUNEVICIUS, R.; HOLLANDER, E.; KASPER, S.; ZOHAR, J.; MÖLLER, H.-J. Guidelines for the pharmacological treatment of anxiety disorders, obsessive–compulsive disorder and posttraumatic stress disorder in primary care. **International Journal of Psychiatry in Clinical Practice**, v. 16, n. 2, p. 77–84, 2012.

BARONCELLI, L.; BRASCHI, C.; SPOLIDORO, M.; BEGENISIC, T.; SALE, A.; MAFFEI, L. Nurturing brain plasticity : impact of environmental enrichment. **Cell Death and Differentiation**, v. 17, n. 7, p. 1092–1103, 2010.

BARONE, S. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: Evidence from humans and animal models. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, n. SUPPL. 3, p. 511–533, 2000.

BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. ETHOEXPERIMENTAL APPROACHES TO THE BIOLOGY OF EMOTION. **Defense**, v. 39, p. 43–68, 1988.

BOURIN, M.; DHONNCHADHA, B. A. N. 5-HT<sub>2</sub> receptors and anxiety. **Drug Development Research**, v. 65, n. 3, p. 133–140, 2005.

BOWLBY, J. **Attachment and loss**, volume 1: Attachment.; New York: Basic Books, 2ª Edição, 1969/82.

BRANDÃO, M. L. (2001). Psicofisiologia: as bases fisiológicas do comportamento. 2ª Ed.; São Paulo: Atheneu.

BRUEL-JUNGERMAN, E.; LAROCHE, S.; RAMPON, C. New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. **European Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 2, p. 513–521, 2005.

BURKE, N. N.; LLORENTE, R.; MARCO, E. M.; TONG, K.; FINN, D. P.; VIVEROS, M.; ROCHE, M. Maternal Deprivation Is Associated With Sex-Dependent Alterations in Nociceptive Behavior and Neuroinflammatory Mediators in the Rat Following Peripheral Nerve Injury. **The Journal of Pain**. v. 14, n. 10, p. 1173–1184, 2013.

CASES, O.; SEIF, I.; GRIMSBY, J.; GASPAR, P.; CHEN, K.; POURNIN, S.; MÜLLER, U.; AGUET, M.; BABINET, C.; SHIH, J. C. Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAOA. **Science (New York, N.Y.)**, v. 268, n. 5218, p. 1763–6, 1995.

CHAOULOFF, F.; BERTON, O.; MORMÈDE, P. Serotonin and stress coping. **Behavioural Brain Research**, v. 277, n. 99, p. 58–67, 1999.

CHARPAK, N.; RUIZ-PELA, J. G. Kangaroo Mother Versus Traditional Care for Newborn Infants. **Pediatrics**, v. 100, n. 4, p. 682–688, 1997.

COURVOISIER, H; MOISAN, M.P; SARRIEAU, A; HENDLEY, E.D; MORMÈDE, P. Behavioral and neuroendocrine reactivity to stress in the WKHA/WKY inbred rat strains: a multifactorial and genetic analysis. **Brain Research**, v. 743, n. 1-2, p. 77-85, 1996.

DAHLSTRÖM, A, FUXE, K. Localization of monoamines in the lower brain stem. **Experientia**, v. 20(7), p. 398-999, 1964.

DEAKIN, J.W.F.; GRAEFF, F.G. 5-HT and mechanisms of defense. **J Psychopharmacol**, v. 5, p. 305–315, 1991.

DIELENBERG, R. A.; MCGREGOR, I. S. Defensive behavior in rats towards predatory odors: A review. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 7-8, p. 597–609, 2001.

DOBBING, J. Vulnerable periods in developing brain. Applied Neurochemistry. Oxford: Blackwell, p 287-316, 1968.

DUBOIS, J.; DEHAENE-LAMBERTZ, G.; KULIKOVA, S.; POUPON, C.; HÜPPI, P. S.; HERTZ-PANNIER, L. The early development of brain white matter: A review of imaging studies in fetuses, newborns and infants. **Neuroscience**, v. 276, p. 48-71, 2014.

EL RAWAS, R.; THIRIET, N.; NADER, J.; LARDEUX, V.; JABER, M.; SOLINAS, M. Early exposure to environmental enrichment alters the expression of genes of the endocannabinoid system. **Brain Research**, v. 1390, p. 80–89, 2011.

ELLENBROEK, B. A.; DE BRUIN, N. M. W. J.; VAN DEN KROONENBURG, P. T. J. M.; VAN LUIJTELAAR, E. L. J. M.; COOLS, A. R. The effects of early maternal deprivation on auditory information processing in adult wistar rats. **Biological Psychiatry**, v. 55, n. 7, p. 701–707, 2004.

ELLENBROEK, B. A.; DERKS, N.; PARK, H. Early maternal deprivation retards neurodevelopment in Wistar rats. **Stress**, v. 8, n. December, p. 247–257, 2005.

ELLENBROEK, B. A.; PH, D.; COOLS, A. R.; PH, D. The Long-Term Effects of Maternal Deprivation Depend on the Genetic Background. **Neuropsychopharmacology**, v. 23, p. 99–106, 2000.

ELLENBROEK, B.A.; VAN DEN KROONENBERG, P.T.; COOLS, A.R. The effects of an early stressful life event on sensorimotor gating in adult rats. **Schizophr.** v. 30, p. 251–260, 1998.

ERSPAMER, V.; B. ASERO. Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine. **Nature**, v.169, n.4306, May 10, p.800-1. 1952.

FALKENBERG, T.; MOHAMMED, A. K.; HENRIKSSON, B.; PERSSON, H.; WINBLAD, B.; LINDEFORS, N. Increased expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat hippocampus is associated with improved spatial memory and enriched environment. **Neuroscience Letters**, v. 138, n. 1, p. 153–156, 1992.

FAN, Y.; SHI, F.; SMITH, J. K.; LIN, W.; GILMORE, J. H.; SHEN, D. Brain anatomical networks in early human brain development. **NeuroImage**, v. 54, p. 1862–1871, 2011.

FATURI, C. B.; TIBA, P. A.; KAWAKAMI, S. E.; CATALLANI, B.; KERSTENS, M.; SUCHECKI, D. Disruptions of the mother-infant relationship and stress-related behaviours: Altered corticosterone secretion does not explain everything. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 34, n. 6, p. 821–834, 2010.

FERNÁNDEZ-TERUEL, A.; GIMÉNEZ-LLORT, L.; ESCORIHUELA, R. M.; GIL, L.; AGUILAR, R.; STEIMER, T.; TOBEA, A. Early-life handling stimulation and environmental enrichment: Are some of their effects mediated by similar neural mechanisms? **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 73, n. 1, p. 233–245, 2002.

FILHO, G. L. B.; ZENKI, K. C.; KALININE, E.; BAGGIO, S.; PETTENUZZO, L.; ZIMMER, E. R.; WEIS, S. N.; CALCAGNOTTO, M. E.; ONOFRE DE SOUZA, D.

A New Device for Step-Down Inhibitory Avoidance Task—Effects of Low and High Frequency in a Novel Device for Passive Inhibitory Avoidance Task That Avoids Bioimpedance Variations. **Plos One**, v. 10, n. 2, p. e0116000, 2015.

FRANCIS, D. D.; CHAMPAGNE, F. a; LIU, D.; MEANEY, M. J. Maternal care, gene expression, and the development of individual differences in stress reactivity. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 896, p. 66–84, 1999.

FRANCIS, D. D.; DIORIO, J.; PLOTSKY, P. M.; MEANEY, M. J. Environmental Enrichment Reverses the Effects of Maternal Separation on Stress Reactivity. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 18, p. 7840–7843, 2002.

FRAZER, A.; HENSLER, J. G. IN: SIEGEL, G. J.; AGRANOFF, B. W.; ALBERS, R. W. Serotonin. **Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects**, v. 6 Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999.

GARDNER E. B.; BOITANO J. J.; MANCINO N. S.; D'AMICO D. P. Environmental enrichment and deprivation: effects on learning, memory and exploration. **Physiol. Behav**, v. 14, p. 321–327, 1975.

GELLER, I. Effect of punishment on lever pressing maintained by food reward or brain stimulation. **Physiology and Behavior**, v. 5, n. 2, p. 203–206, 1970.

GELLER, I.; SEIFTER, J. The effects of meprobamate, barbiturates, danphetamine and promazine on experimentally induced conflict in the rat. **Psychopharmacology**, v. 1, p. 482-492, 1960.

GOLAN, David E. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

GOLD, P. E. The use of avoidance training in studies of modulation of memory storage. **Behavioral and Neural Biology**, v. 46, n. 1, p. 87–98, 1986.

GRAEFF, F. G. Ansiedade. In: Graeff, F. G.; Brandão, M. L. Neurobiologia das doenças mentais. 5ª Ed.; São Paulo: Lemos, 1999.

GRAEFF, F. G.; FERREIRA NETTO, C.; ZANGROSSI, H. The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 2, p. 237–246, 1998

GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. S.; DE ANDRADE, T. G.; DEAKIN, J. F. Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 54(1): 129-141, 1996.

GRAEFF, F. G.; ZANGROSSI, H. JR. The Dual Role of Serotonin in Defense and the Mode of Action of Antidepressants on Generalized Anxiety and Panic Disorders, **Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry**, v. 10(3), p. 207-217, 2010.

GRAEFF, F.G. On serotonin and experimental anxiety. **Psychopharmacology**, v. 163, p. 467-476, 2002.

GRAEFF, F.G. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 28, p. 239-259, 2004.

HAGEN, P. B.; COHEN, L. H. Biosynthesis of indolealkylamines. Physiological release and transport of 5-hydroxytryptamine. In: Eichler O, Farah A (eds). **Handbook of Experimental Pharmacology**. Heidelberg: Springer Verlag Berlin, 1966.

HARATI, H.; BARBELIVIEN, A.; HERBEAUX, K.; MULLER, M. A.; ENGELN, M.; KELCHE, C.; CASSEL, J. C.; MAJCHRZAK, M. Lifelong environmental enrichment in rats: Impact on emotional behavior, spatial memory vividness, and cholinergic neurons over the lifespan. **Age**, v. 35, n. 4, p. 1027–1043, 2013.

HARDAKER, L. A.; SINGER, E.; KERR, R.; ZHOU, G.; SCHAFER, W. R. Serotonin modulates locomotory behavior and coordinates egg-laying and movement in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Neurobiology**, v. 49, n. 4, p. 303–313, 2001.

HEBB, D. O. The effects of early experience on problemsolving at maturity. **Am. Psychol**, v. 2, p. 306–307, 1947.

HEIM, C.; NEMEROFF, C. B. The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. **Biological Psychiatry**, v. 49, p. 1023–1039, 2001.

HEIM, C.; OWENS, M. J.; PLOTSKY, P. M.; NEMEROFF, C. B. The Role of Early Adverse Life Events in the Etiology of Depression and Posttraumatic Stress Disorder. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 821: 194–207, 1997.

HEISLER, L. K.; PRONCHUK, N.; NONOGAKI, K.; ZHOU, L.; RABER, J.; TUNG, L.; YEO, G. S. H.; O'RAHILLY, S.; COLMERS, W. F.; ELMQUIST, J. K.; TECOTT, L. H. Serotonin Activates the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis via Serotonin 2C Receptor Stimulation. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 26, p. 6956–6964, 2007.

HORNUNG, J. P. The human raphe nuclei and the serotonergic system. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 26, n. 4, p. 331–343, 2003.

HOYER, D.; D. E. CLARKE. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). **Pharmacol Rev**, v.46, n.2, Jun, p.157-203. 1994.

HUANG KONKLE, A. T. M.; KENTNER, A. C.; BAKER, S. L.; STEWART, A.; BIELAJEW, C. Environmental-Enrichment-Related Variations in Behavioral, Biochemical, and Physiologic Responses of Sprague-Dawley and Long Evans Rats. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 49, n. 4, p. 427–436, 2010.

HUANG, F. L.; HUANG, K.-P.; WU, J.; BOUCHERON, C. Environmental Enrichment Enhances Neurogranin Expression and Hippocampal Learning and Memory But Fails to Rescue the Impairments of Neurogranin Null Mutant Mice.



**The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 26, n. 23, p. 6230–6237, 2007.

HULLINGERB, R.; O'RIORDANC, K.; BURGER, C. Environmental enrichment improves learning and memory and long-term potentiation in young adult rats through a mechanism requiring mGluR5 signaling and sustained activation of p70s6k. **Neurobiol Learn Mem**, v. 125, n. 2, p. 126–134, 2015.

HUOT, R.L.; THRIVIKRAMAN, K. V.; MEANEY, M.J.; PLOTSKY, P.M. Development of adult ethanol preference and anxiety as a consequence of neonatal maternal separation in Long Evans rats and reversal with antidepressant treatment. **Psychopharmacology (Berl)**. 158, 366–73, 2001.

JACOBS, B. L.; AZMITIA, E. C. Structure and function of the brain serotonin system. **Physiol Rev**, v. 72, n. 1, p. 165–229, 1992.

KACZKURKIN, A. N.; FOA, E. B. Cognitive-behavioral therapy for anxiety disorders: an update on the empirical evidence. – **Servier Research Group Dialogues Clin Neurosci**, v. 17, p. 337–346, 2015.

KESSLER, R. C.; USTUN, T. B. The WHO World Mental Health Survey: Global Perspectives on the Epidemiology of Mental Disorders. **Cambridge University Press, World Health Organization**, p. 450–460, 390–400, 2008.

KOEN, N.; STEIN, D. J. Pharmacotherapy of anxiety disorders: A critical review. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 13, n. 4, p. 423–437, 2011.

KOH, S.; MAGID, R.; CHUNG, H.; STINE, C. D.; WILSON, D. N. Depressive behavior and selective down-regulation of serotonin receptor expression after early-life seizures: reversal by environmental enrichment. **Epilepsy Behav. Author**, v. 10, n. 1, p. 26–31, 2007.

KULESSKAYA, N.; RAUVALA, H.; VOIKAR, V. Evaluation of social and physical enrichment in modulation of behavioural phenotype in C57BL/6J female mice. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, 2011.

KUSSEROW, H.; DAVIES, B.; HÖRTNAGL, H.; VOIGT, I.; STROH, T.; BERT, B.; DENG, D. R.; FINK, H.; VEH, R. W.; THEURING, F. Reduced anxiety-related behaviour in transgenic mice overexpressing serotonin 1A receptors. **Molecular Brain Research**, v. 129, n. 1-2, p. 104–116, 2004.

LAJUD, N.; ROQUE, A.; CAJERO, M.; GUTIÉRREZ-OSPINA, G.; TORNER, L. Periodic Maternal Separation Decreases Hippocampal Neurogenesis without Affecting Basal Corticosterone during the Stress Hyporesponsive Period, but Alters HPA Axis and Coping Behavior in Adulthood. **Psychoneuroendocrinology**, v. 37, n. 3, p. 410–20, 2012.

LAMBAS-SENAS, L.; MNIE-FILALI, O.; CERTIN, V.; FAURE, C.; LEMONE, L.; ZIMMER, L.; HADDJERI, N. Functional correlates for 5-HT1A receptors in maternally deprived rats displaying anxiety and depression-like behav.s. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biol Psychiatry**, v. 33, p. 262–268, 2009.

LARSSON, F.; WINBLAD, B.; MOHAMMED, A. H. Psychological stress and environmental adaptation in enriched vs. Impoverished housed rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 73, n. 1, p. 193–207, 2002.

LAVIOLA, G.; HANNAN, A. J.; MACRÌ, S.; SOLINAS, M.; JABER, M. Effects of enriched environment on animal models of neurodegenerative diseases and psychiatric disorders. **Neurobiology of Disease**, v. 31, n. 2, p. 159–168, 2008.

LEE, J.-H.; KIM, H. J.; KIM, J. G.; RYU, V.; KIM, B.-T.; KANG, D.-W.; JAHNG, J. W. Depressive behaviors and decreased expression of serotonin reuptake transporter in rats that experienced neonatal maternal separation. **Neuroscience Research**, v. 58, n. 1, p. 32–39, 2007.

LEE, R.; SAWA, A. Environmental stressors and epigenetic control of the hypothalamic-pituitary-adrenal-axis (HPA-axis). **Neuroendocrinology**, v. 100, n. 4, p. 278–287, 2014.

LEGER, M.; QUIEDEVILLE, A.; PAIZANIS, E.; NATKUNARAJAH, S.; FRERET, T.; BOULOUARD, M.; SCHUMANN-BARD, P. Environmental Enrichment Enhances Episodic-Like Memory in Association with a Modified Neuronal Activation Profile in Adult Mice. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, 2012.

LEVINE, S. Primary social relationships influence the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. **Physiology and Behavior**, v. 73, n. 3, p. 255–260, 2001.

LI, L.; DU, Y.; LI, N.; WU, X.; WU, Y. Top-down modulation of prepulse inhibition of the startle reflex in humans and rats. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 33, n. 8, p. 1157–1167, 2009.

LIU, D.; DIORIO, J.; DAY, J.C.; FRANCIS, D.D.; MEANEY, M.J. Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. **Nat Neurosci**, v. 3, p. 799–806, 2000.

LIU, D.; DIORIO, J.; TANNENBAUM, B.; CALDJI, C.; FRANCIS, D.; FREEDMAN, A.; SHARMA, S.; PEARSON, D.; PLOTSKY, P.M.; MEANEY, M.J. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. **Science**, v. 277, p. 1659–1662, 1997.

LLORENS-MARTÍN, M. V.; RUEDA, N.; MARTÍNEZ-CUÉ, C.; TORRES-ALEMÁN, I.; FLÓREZ, J.; TREJO, J. L. Both increases in immature dentate neuron number and decreases of immobility time in the forced swim test occurred in parallel after environmental enrichment of mice. **Neuroscience**, v. 147, n. 3, p. 631–638, 2007a.

LLORENTE, R.; ARRANZ, L.; MARCO, E. M.; MORENO, E.; PUERTO, M.; GUAZA, C.; DE LA FUENTE, M.; VIVEROS, M. P. Early maternal deprivation and neonatal single administration with a cannabinoid agonist induce long-term sex-dependent psychoimmunoendocrine effects in adolescent rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 32, n. 6, p. 636–650, 2007b.

LLORENTE, R.; LLORENTE-BERZAL, A.; PETROSINO, S.; MARCO, E.-M.; GUAZA, C.; PRADA, C.; LÓPEZ-GALLARDO, M.; DI MARZO, V.; VIVEROS, M.-P. Gender-dependent cellular and biochemical effects of maternal deprivation on the hippocampus of neonatal rats: a possible role for the endocannabinoid system. **Developmental neurobiology**, v. 68, n. 11, p. 1334–1347, 2008.

LLORENTE, R.; MIGUEL-BLANCO, C.; AISA, B.; LACHIZE, S.; BORCEL, E.; MEIJER, O. C.; RAMIREZ, M. J.; DE KLOET, E. R.; VIVEROS, M. P. Long Term Sex-Dependent Psychoneuroendocrine Effects of Maternal Deprivation and Juvenile Unpredictable Stress in Rats. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 23, n. 4, p. 329–344, 2011.

LLORENTE, R.; O'SHEA, E.; GUTIERREZ-LOPEZ, M. D.; LLORENTE-BERZAL, A.; COLADO, M. I.; VIVEROS, M. P. Sex-dependent maternal deprivation effects on brain monoamine content in adolescent rats. **Neuroscience Letters**, v. 479, n. 2, p. 112–117, 2010.

LLORENTE-BERZAL, A.; FUENTES, S.; GAGLIANO, H.; LÓPEZ-GALLARDO, M.; ARMARIO, A.; VIVEROS, M. P.; NADAL, R. Sex-dependent effects of maternal deprivation and adolescent cannabinoid treatment on adult rat behaviour. **Addiction Biology**, v. 16, n. 4, p. 624–637, 2011.

MACRÌ, S.; CHIAROTTI, F.; WÜRBEL, H. Maternal separation and maternal care act independently on the development of HPA responses in male rats. **Behavioural Brain Research**, v. 191, n. 2, p. 227–234, 2008.

MACRÌ, S.; WÜRBEL, H. Environmental modulation of maternal behavior and behavioural and HPA-responses in rats. **Anim. Behav**, v. 73, p. 171-184, 2007.

MAHAR, I.; BAMBICO, F. R.; MECHAWAR, N.; NOBREGA, J. N. Stress, serotonin, and hippocampal neurogenesis in relation to depression and antidepressant effects. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 38, p. 173–192, 2014.

MARCO, E. M.; LLORENTE, R.; LOPEZ-GALLARDO, M.; MELA, V.; LLORENTE-BERZAL, A.; PRADA, C.; VIVEROS, M.-P. The maternal deprivation animal model revisited. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 51, p. 151–163, 2015.

MARCO, E. M.; MACRÌ, S.; LAVIOLA, G. Critical age windows for neurodevelopmental psychiatric disorders: Evidence from animal models. **Neurotoxicity Research**, v. 19, n. 2, p. 286–307, 2011.

MARCO, E. M.; VALERO, M.; DE LA SERNA, O.; AISA, B.; BORCEL, E.; RAMIREZ, J. M.; VIVEROS, M. Maternal deprivation effects on brain plasticity and recognition memory in adolescent male and female rats. **Neuropharmacology**, v. 68, p. 223–231, 2013.

MATTO, V.; ALLIKMETS, L. Acute and chronic citalopram treatment differently modulates rat exploratory behavior in the exploration box test: no evidence for increased anxiety or changes in the [3H]raclopride binding. **Pharmacology**, v. 58, n. 2, p. 59-69. 1999.

MCGAUGH, J. L.; ROOZENDAAL, B. Drug enhancement of memory consolidation: Historical perspective and neurobiological implications. **Psychopharmacology**, v. 202, n. 1-3, p. 3–14, 2009.

MEANEY, M. J. Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences. **Rev. Neurosci.**, v. 24, p. 1161–192, 2001.

MELA, V.; DÍAZ, F.; GERTLER, A.; SOLOMON, G.; ARGENTE, J.; VIVEROS, M. P.; CHOWEN, J. A. Neonatal Treatment with a Pegylated Leptin Antagonist has a Sexually Dimorphic Effect on Hypothalamic Trophic Factors and Neuropeptide Levels. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 24, n. 5, p. 756–765, 2012.

MENEZES, G. B. De; FONTENELLE, L. F.; MULULO, S.; VERSIANI, M. Treatment-resistant anxiety disorders: social phobia, generalized anxiety disorder and panic disorder. **Rev Bras Psiquiatria**, v. 29, n. Supl II, p. 55–60, 2007.

MESA-GRESA, P.; PÉREZ-MARTINEZ, A.; REDOLAT, R. Environmental enrichment improves novel object recognition and enhances agonistic behavior in male mice. **Aggressive Behavior**, v. 39, n. 4, p. 269–279, 2013.

MIDDLEMISS, D. N.; PRICE, G. W.; WATSON, J. M. Serotonergic targets in depression. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 2, n. 1, p. 18–22, 2002.

MOREIRA, F. A.; LUTZ, B. The endocannabinoid system: Emotion, learning and addiction. **Addiction Biology**, v. 13, n. 2, p. 196–212, 2008.

MORGANE, P. J.; AUSTIN-LAFRANCE, R.; BRONZINO, J.; TONKISS, J.; DÍAZ-CINTRA, S.; CINTRA, L.; KEMPER, T.; GALLER, J. R. Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 17, n. 1, p. 91–128, 1993.

MORGANE, P. J.; MOKLER, D. J.; GALLER, J. R. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 26, n. 4, p. 471–483, 2002.

MORICEAU, S.; ROTH, T. L.; OKOTOGHAIDE, T.; SULLIVAN, R. M. Corticosterone controls the developmental emergence of fear and amygdala function to predator odors in infant rat pups. **Clinical Lymphoma**, v. 9, n. 1, p. 19–22, 2004.

NETO, J. B. B.; TIBA, P. A.; FATURI, C. B.; DE CASTRO-NETO, E. F.; DA GRAA NAFFAH-MAZACORATTI, M.; DE JESUS MARI, J.; DE MELLO, M. F.; SUCHECKI, D. Stress during development alters anxiety-like behavior and hippocampal neurotransmission in male and female rats. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 518–526, 2012.

NITHIANANTHARAJAH, J.; HANNAN, A. J. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 7, n. 9, p. 697–709, 2006.

OITZL, M. S.; CHAMPAGNE, D. L.; VAN DER VEEN, R.; DE KLOET, E. R. Brain development under stress: Hypotheses of glucocorticoid actions revisited. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 34, n. 6, p. 853–866, 2010.

PARK, G. A. S.; PAPPAS, B. A.; MURTHA, S. M.; ALLY, A. Enriched environment primes forebrain choline acetyltransferase activity to respond to learning experience. **Letters, Neuroscience**, v. 143, p. 259–262, 1992.

PAXINOS G., WATSON C., 1986. The rat brain in stereotaxic coordinates. Sydney: Academy.

PHAM, T. M.; ICKES, B.; ALBECK, D.; SODERSTROM, S.; GRANHOLM, A. C.; MOHAMMED, A. H. Changes in brain nerve growth factor levels and nerve growth factor receptors in rats exposed to environmental enrichment for one year. **Neuroscience**, v. 94, n. 1, p. 279–286, 1999.

PINHEIRO, S. N.; DEL-BEN, C. M.; ZANGROSSI, H.; GRAEFF, F. G. Anxiolytic and panicolytic effects of escitalopram in the elevated T-maze. **Journal of psychopharmacology (Oxford, England)**, v. 22, n. 2, p. 132–7, 2008.

POLTRONIERI, S. C.; ZANGROSSI, H.; DE BARROS VIANA, M. Antipanic-like effect of serotonin reuptake inhibitors in the elevated T-maze. **Behavioural Brain Research**, v. 147, n. 1-2, p. 185–192, 2003.

POWELL, C. M.; MIYAKAWA, T. Schizophrenia-Relevant Behavioral Testing in Rodent Models: A Uniquely Human Disorder? **Biol Psychiatry**, v. 59, n. 12, p. 1198–1207, 2006.

QUINTINO-DOS-SANTOS, J. W.; MÜLLER, C. J. T.; BERNABÉ, C. S.; ROSA, C. A.; TUFIK, S.; SCHENBERG, L. C. Evidence that the periaqueductal gray matter mediates the facilitation of panic-like reactions in neonatally-isolated adult rats. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, 2014.

RAMPON, C.; JIANG, C. H.; DONG, H.; TANG, Y. P.; LOCKHART, D. J.; SCHULTZ, P. G.; TSIEN, J. Z.; HU, Y. Effects of environmental enrichment on gene expression in the brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 23, p. 12880–4, 2000.

RAPPORT, M. M.; A. A. GREEN. Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. **J Biol Chem**, v.176, n.3, Dec, p.1243-51. 1948.

RASIKA, S.; ALVAREZ-BUYLLA, A.; NOTTEBOHM, F. BDNF mediates the effects of testosterone on the survival of new neurons in an adult brain. **Neuron**, v. 22, n. 1, p. 53–62, 1999.

RASMUSON, S.; OLSSON, T.; HENRIKSSON, B. G.; KELLY, P. A.; HOLMES, M. C.; SECKL, J. R.; MOHAMMED, A. H. Environmental enrichment selectively increases 5-HT<sub>1A</sub> receptor mRNA expression and binding in the rat hippocampus. **Brain research.Molecular brain research**, v. 53, n. 1-2, p. 285–290, 1998.

RENTESI, G.; ANTONIOU, K.; MARSELOS, M.; FOTOPOULOS, A.; ALBOYCHARALI, J.; KONSTANDI, M. Long-term consequences of early maternal deprivation in serotonergic activity and HPA function in adult rat. **Neuroscience Letters**, v. 480, n. 1, p. 7–11, 2010.

RENTESI, G.; ANTONIOU, K.; MARSELOS, M.; SYRROU, M.; PAPADOPOULOU-DAIFOTI, Z.; KONSTANDI, M. Early maternal deprivation-induced modifications in the neurobiological, neurochemical and behavioral profile of adult rats. **Behavioural Brain Research**, v. 244, p. 29–37, 2013.

REY ES, MARTINEZ HG. Manejo racional del niño prematuro. Curso de Medicina Fetal. **Bogotá: Universidad Nacional**, 1983.

RIBEIRO, L.B. Estratégias não farmacológicas para prevenção dos efeitos de longo prazo da separação maternal. Dissertação, Universidade Federal do Espírito Santo, PPGBF, 2015.

ROTS, N. Y.; DE JONG, J.; WORKEL, J. O.; LEVINE, S.; COOLS, A. R.; DE KLOET, E. R. Neonatal maternally deprived rats have as adults elevated basal pituitary-adrenal activity and enhanced susceptibility to apomorphine. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 8, n. 7, p. 501–506, 1996.

SÁNCHEZ, M.M.; LADD, C.O. PLOTSKY PM. Early adverse experience as a developmental risk factor for later psychopathology: evidence from rodent and primate models. **Dev Psychopathol**, v. 13(3), p. 419-449, 2001.

SANDERS-BUSH, E.; HAZELWOOG, L. 5-Hidroxitriptamina (serotonina) e dopamina. In: Brunton, L.L.; Chabner, B.A.; Knollmann, B.C. (organizadores). **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12ª ed., McGraw Hill, p.335-351, 2012.

SAPHIER, D.; WELCH, J. O. N. E.; FARRAR, G. E.; NGUYEN, N. H. U. Q.; AGUADO, F.; THALLER, T. R.; KNIGHTS, D. S. Interactions between serotonin, thyrotropin-releasing hormone, and substance p in the CNS regulation of adrenocortical secretion. **Psychoneuroendocrinology**, v. 19, n. 8, p. 779–797, 1994.

SAPOLSKY, R.M., MEANEY, M.J. Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. **Brain Res**. V. 396, p. 64—76, 1986.

SCHMIDT, M. V.; OITZL, M. S.; LEVINE, S.; DE KLOET, E. R. The HPA system during the postnatal development of CD1 mice and the effects of maternal deprivation. **Developmental Brain Research**, v. 139, p. 39-49, 2002.

SMITH, S. M.; VALE, W. W. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 8, n. 4, p. 383–395, 2006.

STEIN, L.; WISE, C. D.; BELLUZZI J. D. Effect of benzodiazepines on central serotonergic mechanisms. **Advances in Biochemical Psychopharmacology**, v. 14, p. 26-44, 1975.

SUÁREZ, J.; LLORENTE, R.; ROMERO-ZERBO, S. Y.; MATEOS, B.; BERMÚDEZ-SILVA, F. J.; DE FONSECA, F. R.; VIVEROS, P. Early maternal deprivation induces gender-dependent changes on the expression of hippocampal CB1 and CB2 cannabinoid receptors of neonatal rats. **Hippocampus**, v. 19, n. 7, p. 623–632, 2009.

SUÁREZ, J.; RIVERA, P.; LLORENTE, R.; ROMERO-ZERBO, S. Y.; BERMÚDEZ-SILVA, F. J.; DE FONSECA, F. R.; VIVEROS, M.-P. V. Early maternal deprivation induces changes on the expression of 2-AG biosynthesis and degradation enzymes in neonatal rat hippocampus. **Brain Research**, v. 1349, p. 162–173, 2010.

SULLIVAN, R.M. Developing a sense of safety: the neurobiology of neonatal attachment. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1008, 122–31, 2003.

TAKAHASHI, L. K. Ontogeny of behavioral inhibition induced by unfamiliar adult male conspecifics in preweanling rats. **Physiology and Behavior**, v. 52, n. 3, p. 493–498, 1992.

TAKAHASHI, L. K.; TURNER, J. G.; KALIN, N. H. Development of Stress-Induced Responses in Preweanling < Rats. **Developmental Psychobiology**, v. 24, n. 5, p. 341–360, 1991.

TANG, Y. P.; WANG, H.; FENG, R.; KYIN, M.; TSIEN, J. Z. Differential effects of enrichment on learning and memory function in NR2B transgenic mice. **Neuropharmacology**, v. 41, n. 6, p. 779–790, 2001.

TESSIER, R.; CRISTO, M.; VELEZ, S.; GIRON, M.; DE CALUME, Z. F.; RUIZ-PALAEZ, J. G.; CHARPAK, Y.; CHARPAK, N.; Kangaroo mother care and the bonding hypothesis. **Pediatrics**, v. 102, n. 2, p. e17, 1998.

TWAROG, B.M.; PAGE, I.H. Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. *Am J Physiol* **175**: 157–161, 1953.

TYCE, G. M. Origin and metabolism of serotonin. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 16: 1-7, 1990.

VAN OERS, H. J. J.; RONALD DE KLOET, E.; LEVINE, S. Persistent, but Paradoxical, Effects on HPA Regulation of Infants Maternally Deprived at Different Ages. **Stress: The International Journal on the Biology of Stress**, v. 1, n. 4, p. 249–261, 1997.

VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F. H. Neural consequences of environmental enrichment. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 1, n. December, p. 191–198, 2000.

VÁZQUEZ, D. M.; LÓPEZ, J. F.; VAN HOERS, H.; WATSON, S. J.; LEVINE, S. Maternal deprivation regulates serotonin 1A and 2A receptors in the infant rat. **Brain Research**, v. 855, n. 1, p. 76–82, 2000.

VEDOVELLI, K.; SILVEIRA, E.; VELHO, E.; STERTZ, L.; KAPCZINSKI, F.; SCHRÖDER, N.; BROMBERG, E. Effects of increased opportunity for physical

exercise and learning experiences on recognition memory and brain-derived neurotrophic factor levels in brain and serum of rats. **Neuroscience**, v. 199, p. 284–291, 2011.

VIANA, M. B.; TOMAZ, C.; GRAEFF, F. G. The elevated T-maze: A new animal model of anxiety and memory. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 49, n. 3, p. 549–554, 1994.

VISSER, A. K. D.; VAN WAARDE, A.; WILLEMSSEN, A. T. M.; BOSKER, F. J.; LUITEN, P. G. M.; DEN BOER, J. A.; KEMA, I. P.; DIERCKX, R. A. J. O. Measuring serotonin synthesis: From conventional methods to PET tracers and their (pre)clinical implications. **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v. 38, n. 3, p. 576–591, 2011.

VIVEROS, M. P.; DÍAZ, F.; MATEOS, B.; RODRÍGUEZ, N.; CHOWEN, J. A. Maternal deprivation induces a rapid decline in circulating leptin levels and sexually dimorphic modifications in hypothalamic trophic factors and cell turnover. **Hormones and Behavior**, v. 57, n. 4-5, p. 405–414, 2010.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A.; BUDTZ-OLSEN, O.; EICHELMAN, B.; HORVATH, T.; LEE, A. The Open-Field Test: A Critical Review. **Psychological Bulletin**, v. 83, n. 3, p. 482–504, 1976.

WALTHER, D. J.; J. U. PETER. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. **Science**, v.299, n.5603, p.76. 2003.

WEISSTAUB, N. V. Cortical 5-HT<sub>2A</sub> Receptor Signaling Modulates Anxiety-Like Behaviors in Mice. **Science**, v. 313, n. 5786, p. 536–540, 2006.

WIDMAN, D. R.; ROSELLINI, R. A. Restricted daily exposure to environmental enrichment increases the diversity of exploration. **Physiology and Behavior**, v. 47, n. 1, p. 57–62, 1990.

WIEDENMAYER, C. P.; BARR, G. A. Developmental changes in c-fos expression to an age-specific social stressor in infant rats. **Behavioural Brain Research**, v. 126, n. 1-2, p. 147–157, 2001.

WIMALASENA, K. Vesicular Monoamine Transporters: Structure-Function, Pharmacology, and Medicinal Chemistry. **Med Res Rev**, v. 31, n. 4, p. 483–519, 2011.

WORKU, B.; KASSIE, A. Kangaroo Mother Care: A randomized controlled trial on effectiveness of early Kangaroo Mother Care for the low birthweight infants in Addis Ababa, ethiopia. **Journal of Tropical Pediatrics**, v. 51, n. 2, p. 93–97, 2005.

XU, Z.; HOU, B.; ZHANG, Y.; GAO, Y.; WU, Y.; ZHAO, S.; ZHANG, C. Antidepressive behaviors induced by enriched environment might be modulated by glucocorticoid levels. **European Neuropsychopharmacology**, v. 19, n. 12, p. 868–875, 2009.



YOUNG, D.; LAWLOR, P. a; LEONE, P.; DRAGUNOW, M.; DURING, M. J. Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective. **Nature medicine**, v. 5, n. 4, p. 448–53, 1999.

ZAMBERLETTI, E.; PRINI, P.; SPEZIALI, S.; GABAGLIO, M.; SOLINAS, M.; PAROLARO, D.; RUBINO, T. Gender-dependent behavioral and biochemical effects of adolescent delta-9-tetrahydrocannabinol in adult maternally deprived rats. **Neuroscience**, v. 204, p. 245–257, 2012.

ZANGROSSI, H.; GRAEFF, F. G. Behavioral validation of the elevated T-maze, a new animal model of anxiety. **Brain Research Bulletin**, v. 44, n. 1, p. 1–5, 1997.

ZANGROSSI, H.; VIANA, M. B.; ZANOVELI, J.; BUENO, C.; NOGUEIRA, R. L.; GRAEFF, F. G. Serotonergic regulation of inhibitory avoidance and one-way escape in the rat elevated T-maze. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 7-8, p. 637–645, 2001.

ZIMMERBERG, B.; SHARTRAND, A. M. Temperature dependent effects of maternal separation on growth, activity, and amphetamine sensitivity in the rat. **Developmental Psychobiology**, v. 25, n. 3, p. 213–226, 1992.

## *Apêndice*

## APÊNDICE

### ESTUDO PILOTO

#### 1. Justificativa

Eventos traumáticos no período perinatal podem prejudicar o desenvolvimento fisiológico e psicológico dos filhotes, podendo causar alterações a curto e longo prazo. O estresse neonatal consiste em um modelo animal utilizado para mimetizar os efeitos de experiências traumáticas no período perinatal. Na literatura, são descritos diversos protocolos de separação materna, que podem variar desde poucos minutos até 6 horas diárias, durante os primeiros dias de vida, ou mesmo um período contínuo de 24 horas de privação materna. Em comum esses protocolos correspondem eventos adversos no início da vida e podem causar alterações em respostas comportamentais na vida adulta, como depressão, prejuízos na memória e aprendizado, abuso de substâncias e transtornos de ansiedade. Com a variabilidade de protocolos de estresse neonatal e consequentemente diferentes respostas comportamentais, faz-se necessário a investigação de qual desses modelos seria ideal para a avaliação da ansiedade. Sendo assim, o presente estudo piloto teve como objetivo comparar diferentes protocolos de estresse neonatal, com a finalidade de selecionar um desses protocolos para posterior análise comportamental e neuroquímica dos efeitos do estresse neonatal sobre comportamentos relacionados a ansiedade.

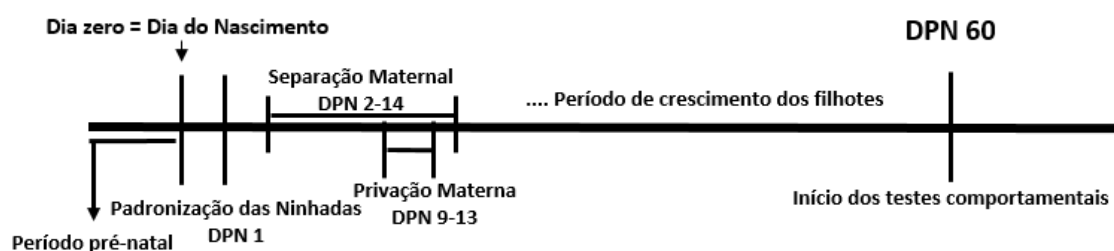
#### 2. Estudo 1

##### Comparação entre diferentes protocolos de privação materna

##### 2.1. Métodos

A fim de comprar o comportamento de animais submetidos a diferentes protocolos de separação materna em testes de ansiedade, foram utilizados ninhadas de ratos Wistar, padronizadas em 8 animais por ninhada, que foram

submetidas a diferentes protocolos de separação, nos quais: separação maternal por 180 minutos diários (SM180), separação maternal 360 minutos diários (SM360), privação maternal nos dias 9 e 11 após o nascimento (PM 9 e 11) e privação maternal nos dias 11 e 13 após o nascimento (PM 11 e 13). Após o nascimento os animais permaneceram em ambiente de crescimento padrão, sofrendo o mínimo de manipulação possível. A partir do dia 60 após o nascimento os animais foram submetidos aos testes comportamentais, sendo eles: labirinto em T elevado e teste do campo aberto.



**Figura 1:** esquema do delineamento experimental do estudo 1.

## 2.2. Resultados

### 2.2.2. Labirinto em T elevado

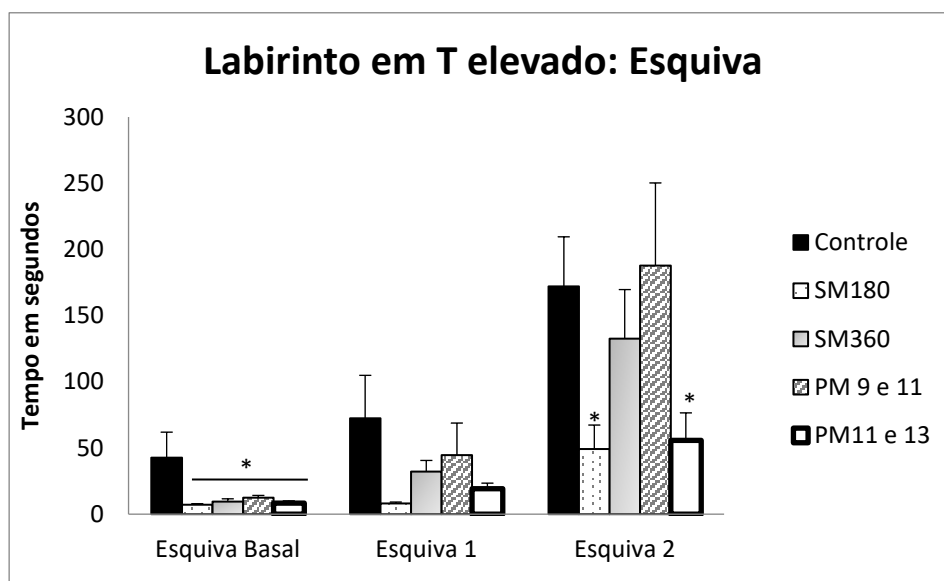
#### *Esquiva Inibitória*

Os comportamentos de esquiva inibitória foram avaliados em três tentativas seguidas, esquiva basal, esquiva 1 e esquiva 2. A fim de comparar os grupos durante a esquiva inibitória, foi realizada uma ANOVA de uma via, seguida do teste *pós-hoc* de Duncan.

Ao analisar o tempo de esquiva basal, observamos diferença significativa entre os grupos, no qual todos os protocolos de estresse neonatal se comportaram diferentes do grupo controle [ANOVA de uma via,  $F(6,83) = 2,46$ ;  $P = 0,03$ ]. Não houve diferença significativa para o tempo de esquiva inibitória 1 [ANOVA de uma via,  $F(6,83) = 1,22$ ], entretanto foi observado diferença significativa entre os grupos na esquiva 2, sendo observado que o grupo separação maternal 180 minutos e o grupo privação materna nos dias 11 e 13 são diferentes do grupo controle [ANOVA de uma via,  $F(6,83) = 2,5$ ;  $P = 0,02$ ].

Ainda na esquiva inibitória, observamos na ANOVA de medidas repetidas, que houve um efeito das sessões de esquiva durante o teste [ANOVA de

medidas repetidas,  $F(2,83) = 36,71$ ;  $P < 0,0001$ ] indicando que ocorreu aprendizado.

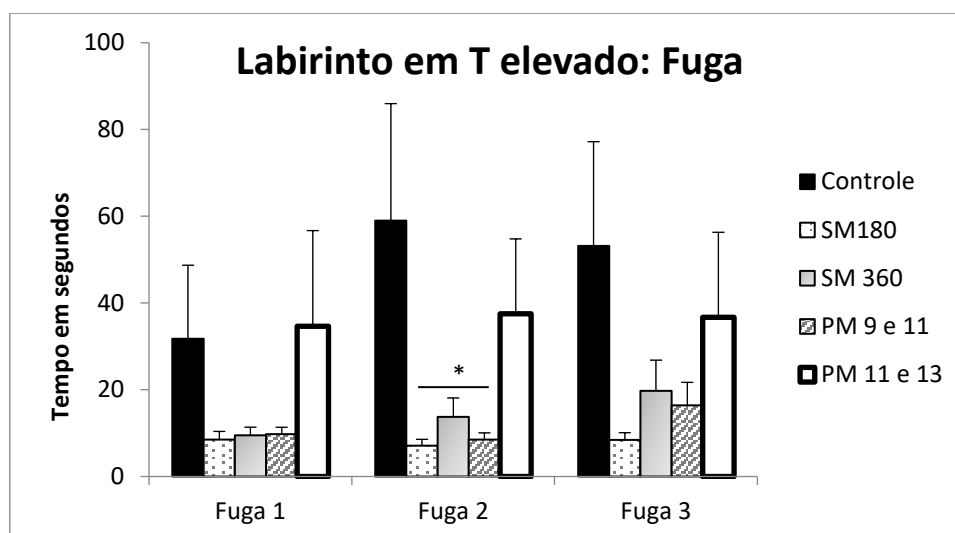


**Figura 2:** Latência, em segundos, para sair do compartimento fechado do Labirinto em T elevado. Dados expressos como média,  $N = 11-13$  por grupo.

\*: Diferente do grupo controle (teste de Duncan,  $P < 0,05$ ).

### Fuga

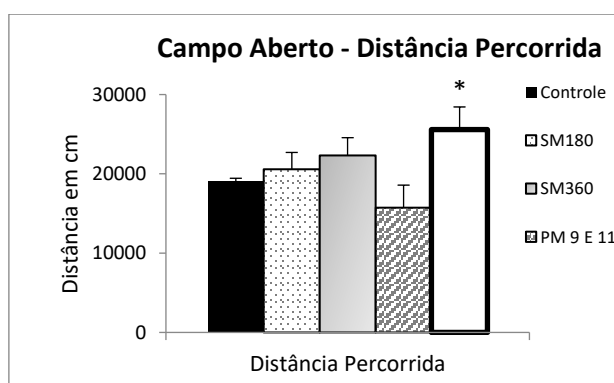
Os comportamentos de fuga também foram avaliados em três tentativas seguidas e analisados por meio de ANOVA de uma via, seguida do teste *pós-hoc* de Duncan. Não foi observado diferença significativa entre os grupos na Fuga 1 [ANOVA de uma via,  $F(6,83) = 1,19$ ;  $P = 0,31$ ]. No entanto, observamos diferença entre os grupos no tempo de Fuga 2, no qual os grupos, separação maternal 180 minutos, separação maternal 360 minutos e privação maternal nos dias 9 e 11, foram diferentes do grupo controle [ANOVA de uma via,  $F(6,83) = 2,41$ ;  $P < 0,03$ ]. Essa diferença não foi evidenciada no tempo de fuga 3, havendo apenas uma tendência de diferença significativa, no qual o grupo separação maternal 180 minutos foi diferente do ao grupo controle [ANOVA de uma via,  $F(6,83) = 1,93$ ;  $P < 0,08$ ].



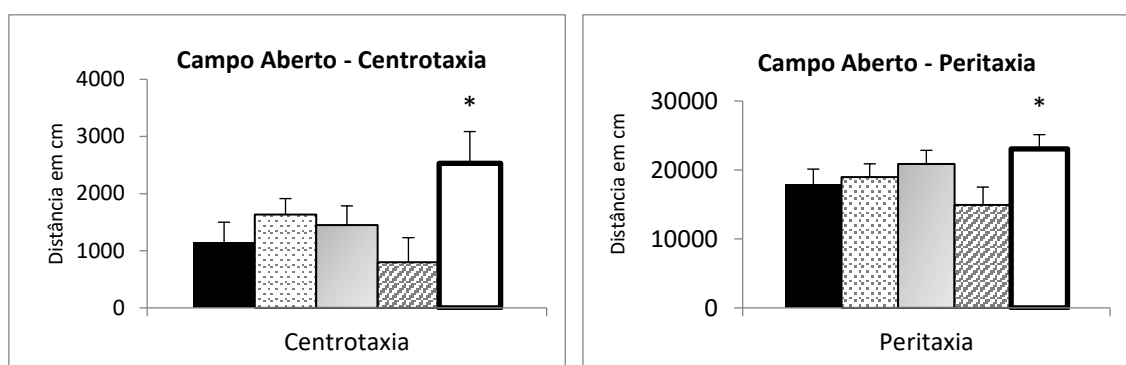
**Figura 3:** Latência (em segundos) para fuga do braço aberto do Labirinto em T elevado. Dados expressos como média + EPM, N = 11-13 por grupo. \*: Diferente do grupo controle (teste de Duncan,  $P < 0,05$ ).

### 2.2.3 Teste do Campo Aberto

No teste de campo aberto, observamos que na distância percorrida na área central do campo aberto, houve uma tendência de diferença entre os grupos, [ANOVA de uma via,  $F(6,79) = 1,94$ ;  $P = 0,08$ ], no qual o *post-hoc* de Duncan indicou diferença entre os grupos PM 11 e 13, controle e do grupo PM 9 e 11. Quanto a distância permanência na periferia, a ANOVA de uma via também indicou uma tendência a diferença entre os grupos [ANOVA de uma via,  $F(6,79) = 2,04$ ;  $P = 0,06$ ], no qual o *post-hoc* de Duncan indicou diferença entre os grupos PM 11 e 13 e do grupo PM 9 e 11. Na análise da distância total percorrida, a ANOVA indicou diferença entre os grupos, [ANOVA de uma via,  $F(6,79) = 2,19$ ;  $P = 0,05$ ], qual o *post-hoc* de Duncan indicou diferença entre os grupos PM 11 e 13 e do grupo PM 9 e 11.



**Figura 4:** Distância total percorrida. Dados expressos como média + EPM, N = 9-12 por grupo. \*: Diferente do grupo controle (teste de Duncan,  $p < 0,05$ ).



**Figura 5:** Distância percorrida no centro do aparato. Dados expressos como média + EPM, N = 9-12 por grupo. \*: Diferente do grupo controle (teste de Duncan,  $P = 0,08$ ).

**Figura 6:** Distância percorrida na periferia do aparato. Dados expressos como média + EPM, N = 9-12 por grupo. \*: Diferente do grupo controle (teste de Duncan,  $P = 0,06$ ).

### 3. Estudo 2

#### Validação farmacológica do modelo de privação maternal

#### 3.2. Métodos

No estudo 1 observamos diferenças entre os protocolos de estresse neonatal, o que demonstrou que o período em que o estresse ocorre está relacionado com as alterações comportamentais encontradas. Observamos que a privação maternal nos DPNs 11 e 13 provocou diminuição no tempo na esquiiva inibitória, no teste do labirinto em T elevado e aumento da atividade locomotora no teste do campo aberto, sendo o modelo de estresse neonatal que apresentou resultados mais expressivos.

Nesse modelo, o aumento a atividade locomotora pode estar associado a diminuição do tempo de esquiava, uma vez que a locomoção interfere diretamente no comportamento do LTE. Além disso, estudos indicam que a privação maternal aumenta comportamentos relacionados a esquizofrenia, como a atividade locomotora (ELLENBROEK & COOLS, 2000; ELLENBROEK et al., 2005).

Sendo assim, a fim de confirmar os resultados encontrados, propomos verificar se o pré-tratamento com uma droga ansiolítica (diazepam), altera os resultados obtidos nos testes comportamentais, uma vez que a atividade

locomotora poderia estar mascarando os efeitos da privação maternal na esquiva inibitória.

Para isso, foram utilizadas ninhadas de ratos Wistar, padronizadas em 8 animais por ninhada, que foram submetidas ao protocolo de privação maternal nos dias 11 e 13 após o nascimento (PM 11 e 13). Após o nascimento os animais permaneceram em ambiente de crescimento padrão, sofrendo o mínimo de manipulação possível. A partir do dia 60 após o nascimento os animais foram submetidos aos testes comportamentais, sendo eles: labirinto em T elevado e teste do campo aberto. Para a realização dos testes, os grupos experimentais foram subdivididos em:

- Controle salina
- Controle diazepam (DZP)
- Privação maternal salina
- Privação maternal DZP

Para a realização dos experimentos, os animais dos grupos diazepam, receberam injeções, na dose de 1mg/kg, 30 minutos antes da exposição aos testes. Os animais dos grupos salina, também receberam injeções 30 minutos antes da realização dos testes.



**Figura 7:** esquema do delineamento experimental do estudo 2.

### 3.3. Resultados

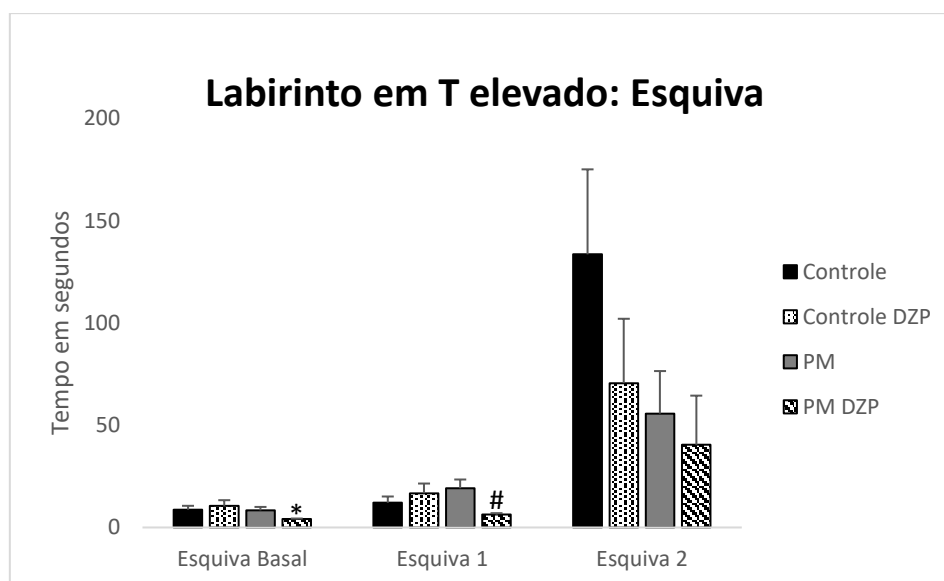
#### 3.3.3. Labirinto em T elevado

##### *Esquiva Inibitória*



Ao analisar o tempo de esquiva inibitória, observamos através da ANOVA de medidas repetidas, que houve um efeito das sessões de esquiva [ANOVA de medidas repetidas,  $F(3,43) = 18,60$ ;  $P < 0,000$ ] indicando que ocorreu aprendizado durante o teste. Entretanto, não foi observada interação entre as sessões e a privação maternal, o Diazepam ou interação entre os três fatores [ANOVA de medidas repetidas, Sessão\*PM  $F(3,43) = 2,7$ ; Sessão\*DZP  $F(3,43) = 1,43$ ; Sessão\*PM\*DZP  $F(3,43) = 0,39$ ]. Com relação ao efeito das sessões entre as variáveis, observamos efeito da privação maternal e do diazepam, sem interação entre os fatores ([PM  $F(3,43) = 6,56$ ;  $P = 0,014$ ]; [DZP  $F(3,43) = 5,12$ ;  $P = 0,029$ ]; [PM\*DZP  $F(3,43) = 2,56$ ]).

Além disso, observamos uma tendência de efeito da privação maternal na esquiva basal [ANOVA de duas vias,  $F(3,43) = 3,56$ ;  $P = 0,06$ ], sem efeito do diazepam [ANOVA de duas vias,  $F(3,43) = 2,83$ ], ou interação entre os fatores [ANOVA de duas vias,  $F(3,43) = 1,66$ ]. No tempo de esquiva 1, não observamos efeito da privação maternal [ANOVA de duas vias,  $F(3,43) = 3,03$ ], entretanto observamos tendência de efeito do diazepam [ANOVA de duas vias,  $F(3,43) = 3,51$ ;  $P = 0,06$ ], sem interação entre os fatores [ANOVA de duas vias,  $F(3,43) = 1,38$ ]. No tempo de esquiva 2, observamos efeito da privação maternal [ANOVA de duas vias,  $F(3,43) = 5,83$ ;  $P = 0,02$ ], tendência de efeito do diazepam [ANOVA de duas vias,  $F(3,43) = 3,71$ ;  $P = 0,06$ ], sem haver interação entre os fatores [ANOVA de duas vias,  $F(3,43) = 2,02$ ]. O teste de Duncan também indicou diferença entre os grupos PM DZP e Controle DZP na esquiva basal, e entre os grupos PM e PM DZP na esquiva 1 ( $P < 0,05$ ).

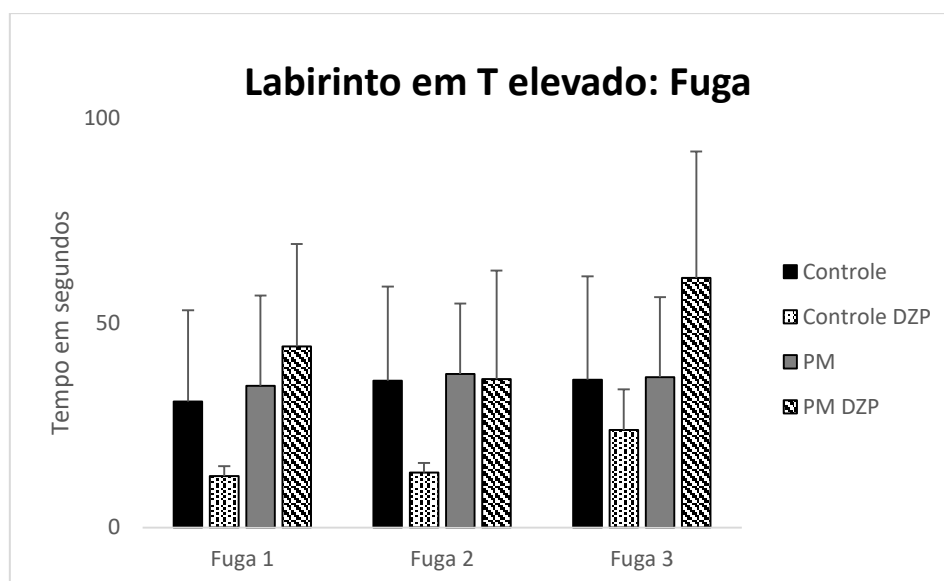


**Figura 8:** Latência, em segundos, para sair do compartimento fechado do Labirinto em T elevado. Dados expressos como média + EPM, N = 10-12 por grupo. \*: Diferente de todos os grupos (teste de Duncan,  $p < 0,05$ ); #: Diferente do grupo PM (teste de Duncan,  $p < 0,05$ ).

### Fuga

Os comportamentos de fuga também foram avaliados em três tentativas seguidas e analisados por meio de ANOVA de duas vias. Não foram observadas diferenças na Fuga 1 {PM [ANOVA de duas vias,  $F(3,43) = 0,89$ ]; DZP [ANOVA de duas vias,  $F(3,43) = 0,68$ ]; PM\*DZP [ANOVA de duas vias,  $F(3,43) = 0,62$ ]}, na Fuga 2 {PM [ANOVA de duas vias,  $F(3,43) = 0,001$ ]; DZP [ANOVA de duas vias,  $F(3,43) = 1,23$ ]; PM\*DZP [ANOVA de duas vias,  $F(3,43) = 1,10$ ]} ou na fuga 3 {PM [ANOVA de duas vias,  $F(3,43) = 0,21$ ]; DZP [ANOVA de duas vias,  $F(3,43) = 0,13$ ]; PM\*DZP [ANOVA de duas vias,  $F(3,43) = 1,14$ ]}.

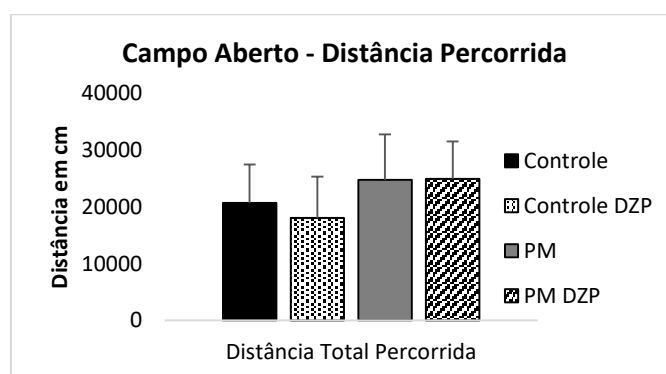
Além disso, o *pós-hoc* de Duncan não demonstrou diferença significativa entre os grupos na Fuga 1, Fuga 2 ou na Fuga 3 ( $P > 0,05$ ).



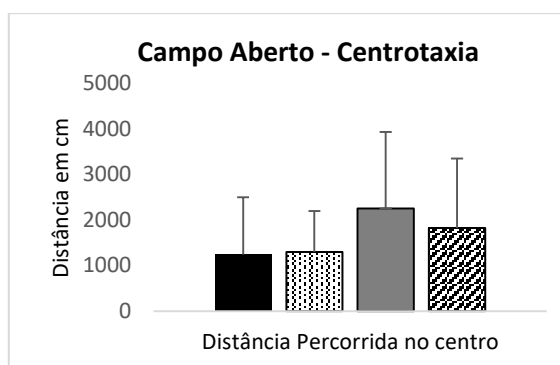
**Figura 9:** Latência, em segundos, para sair do compartimento aberto do Labirinto em T elevado. Dados expressos como média + EPM, N = 10-12 por grupo.

### 3.3.4. Campo Aberto

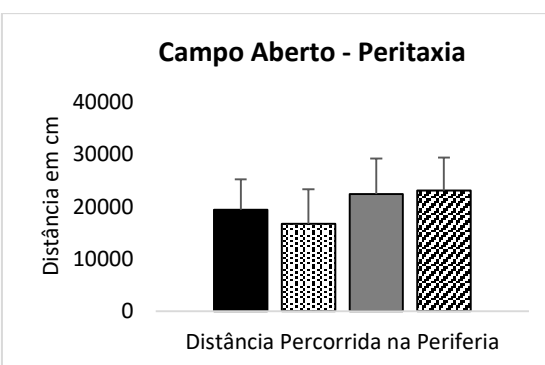
No teste de campo aberto, a ANOVA de duas vias para a distância total percorrida indicou efeito da privação maternal [ANOVA de duas vias,  $F(3,41) = 5,58$ ;  $P = 0,02$ ]. Entretanto, sem efeito do diazepam [ANOVA de duas vias,  $F(3,41) = 0,49$ ], ou interação entre os fatores [ANOVA de duas vias,  $F(3,41) = 0,04$ ]. Da mesma forma, houve efeito da privação na distância percorrida na periferia do aparato, [ANOVA de duas vias,  $F(3,41) = 5,12$ ;  $P = 0,02$ ], sem efeito do diazepam [ANOVA de duas vias,  $F(3,41) = 0,42$ ], ou interação entre os fatores [ANOVA de duas vias,  $F(3,41) = 0,04$ ]. Quanto a distância percorrida no centro do aparato, não houve efeito significativo de nenhuma das condições [ANOVA de duas vias, PM:  $F(3,41) = 3,74$ ; DZP:  $F(3,41) = 0,44$ ; PM\*DZP  $F(3,41) = 0,63$ ].



**Figura 10:** Distância total percorrida. Dados expressos como média + EPM, N = 10-11 por grupo.



**Figura 11:** Distância percorrida no centro do aparato. Dados expressos como média + EPM, N = 10-11 por grupo.



**Figura 12:** Distância percorrida na periferia do aparato. Dados expressos como média + EPM, N = 10-11 por grupo.

#### 4. Conclusão

De acordo com os resultados encontrados nos estudos pilotos, pode-se concluir que a privação materna realizada nos dias 11 e 13 após o nascimento provocou alterações comportamentais na esquia inibitória e na atividade locomotora, o que foi prevenido pelo fármaco ansiolítico. Sendo assim, concluímos que o estresse neonatal aplicado nos dias 11 e 13 após o nascimento, representam um possível modelo para o estudo de alterações associadas a ansiedade em animais adultos.

#### 5. Referências

ELLENBROEK, B. A.; DERKS, N.; PARK, H. Early maternal deprivation retards neurodevelopment in Wistar rats. **Stress**, v. 8, n. December, p. 247–257, 2005.

ELLENBROEK, B. A.; PH, D.; COOLS, A. R.; PH, D. The Long-Term Effects of Maternal Deprivation Depend on the Genetic Background. **Neuropsychopharmacology**, v. 23, p. 99–106, 2000.